

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Papel de los endocannabinoides y ácidos grasos en la regulación de los
canales auriculares humanos Kv1.5**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Adriana Barana Muñoz

Directores

Juan Tamargo Menéndez
Eva Delpón Mosquera
Ricardo Caballero Collado

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**PAPEL DE LOS ENDOCANNABINOIDES Y ÁCIDOS
GRASOS EN LA REGULACIÓN DE LOS CANALES
AURICULARES HUMANOS Kv1.5**

TESIS DOCTORAL

Adriana Barana Muñoz

DIRECTORES

Prof. Juan Tamargo Menéndez

Prof. Eva Delpón Mosquera

Prof. Ricardo Caballero Collado

Madrid, 2014

A mi pequeña gran familia

A mis padres, que lo han dado todo por mí
A Joan, por ser mi mejor compañero de viaje
A Carlota, por darme el último empujón

Agradecimientos

Agradecimientos

Me alegra poder empezar esta Tesis Doctoral agradeciendo a todas las personas que de una u otra manera han participado en ella, ya que sin ellos la realización de este trabajo hubiera sido imposible. Durante los últimos años ha habido muchas personas que me han apoyado y ayudado y espero no olvidarme de ninguna al agradecer sinceramente su colaboración.

En primer lugar quiero agradecer la atención, la dedicación y la enseñanza a mis directores de Tesis, los Profesores Juan Tamargo Menéndez, Eva Delpón Mosquera y Ricardo Caballero Collado.

Al Profesor Juan Tamargo Menéndez, por haberme acogido en su grupo de investigación, dándome así la posibilidad de trabajar a su lado y de aprender tanto de él, eres un gran maestro. Por su apoyo y ayuda siempre.

A la Profesora Eva Delpón Mosquera, por haberme formado como investigadora y por ser todo un ejemplo de esfuerzo y dedicación al trabajo. Gracias por confiar en mí desde el principio y durante estos años.

Al Profesor Ricardo Caballero Collado, por todo lo que me ha enseñado desde que llegué al laboratorio y porque siempre está dispuesto a ayudar y a solucionar todos los “problemas técnicos”. Muchas gracias.

A los primeros compañeros en el laboratorio, los Dres Lucía Núñez, Miguel Vaquero y Ricardo Gómez, porque tuvieron toda la paciencia del mundo para enseñar los trucos de la electrofisiología a una novata como yo. Gracias en especial al Dr. Ricardo Gómez por su dedicación y apoyo en los primeros momentos de desánimo.

A Lupe, porque me enseñó todo lo que sé de cultivos celulares haciendo que los principios fueran mucho más fáciles gracias a su buen humor todas las mañanas. Y a Ari, porque fue un placer conocerla y compartir con ella el principio.

Agradecimientos

Sin duda, si a alguien debo estar agradecida es a mis compañeros de laboratorio. En primer lugar a la Dra Irene Amorós García, nadie mejor que ella para entender qué pasa cuando mezclas cannabinoides y electrofisiología! Porque haber entrado a la vez une, y porque su compañía todos estos años, y los que nos quedan, me han ayudado a seguir adelante. A la Dra Marta González de la Fuente, a la que echo tanto de menos después de cuatro años de convivencia y confianzas tanto dentro como fuera del laboratorio.

Al Licenciado Pablo Dolz Gaitón, por introducir criterio masculino y haber sobrevivido. Ánimo con esa tesis, que no queda nada.

A Sandra Sacristán García, la jefa de los miocitos. Por tu vitalidad y tu divertida compañía en las frutas al sol.

A Paloma Vaquero, por los buenos ratos que haces que pasemos contigo y por preocuparte siempre de los demás. Gracias.

A las últimas incorporaciones del laboratorio, Marta, Marcos y Mercedes. Por agrandar la familia y traer aire nuevo. Seguid trabajando duro, y yo que lo vea.

Al Profesor Manuel Guzmán por habernos introducido en el fantástico mundo de los cannabinoides y haber estado siempre dispuesto a solucionar nuestras dudas y a la Dra Cristina Blázquez por su activa colaboración.

A la Dra. Pilar Lillo, del Instituto de Física Química “Rocasolano” del CSIC, por su ayuda en los experimentos de dinámica de membranas llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral.

A los Dres. Almendral, Atienza, Fernández-Avilés, Pinto y demás equipo de los servicios de Cardiología y de Cirugía Cardiovascular del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, por proporcionarnos las muestras auriculares humanas utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Agradecimientos

A los Profesores María Isabel Colado Megía y a Ignacio Lizasoain Hernández, actual y anterior director del Departamento, y en general, a todo el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por haber facilitado mi labor en el Departamento en todo momento.

Al Instituto de Salud Carlos III y a la red HERACLES por financiar mi estancia durante este periodo pre-doctoral.

Summary

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

Atrial fibrillation (AF) is the most common sustained cardiac arrhythmia in clinical practice. Its incidence increases two-fold per decade after 55 years of age, affecting $\approx 5\%$ of population over 65 years of age. AF alters electrophysiological, structural and contractile atrial properties in a way that promotes both the occurrence and persistence of the arrhythmia, a phenomenon called “atrial remodelling”. Electrical remodelling mainly consists of an inhomogeneous shortening of both action potential (AP) and atrial refractory period durations (APD and ARP respectively), which allows for a higher number of excitation wave fronts to coexist simultaneously and disorderly in the atria. The shortening of APD and ARP are caused by changes in the expression levels of the channels that generate the currents that underlie the atrial AP. In the human atrial myocardium, the height and duration of the plateau phase of the AP are determined by the balance between the inward L-type Ca^{2+} current (I_{CaL}) and two outward K^{+} currents, the 4-aminopyridine-sensitive component of the transient outward current (I_{to1}) and the ultrarapid component of the delayed rectifier current (I_{Kur}). Kv1.5 channels underlie the I_{Kur} . This current is absent in the human ventricle and, hence, represents a suitable target for selectively modulating atrial AP duration.

The endocannabinoid system (ECS) is a modulating system that regulates the nervous, immune and endocrine systems, although its effects can affect many other systems such as the cardiovascular one. Endocannabinoids (EC) and endocannabinoid analogues are synthesized on demand from lipid precursors at the plasma membranes of virtually all cell types both in the brain and peripheral tissues, including the myocardium, where they modulate cardiac contractility and frequency and exert cardioprotective and antiarrhythmic actions in ischemia-reperfusion models. Several physiological roles attributed to anandamide (AEA), including modulation of neuronal excitability, pain, and cardiovascular functions, are at least in part independent of CB receptor activation. It has been demonstrated that EC and EC-related compounds modulate functional properties of Na^{+} , K^{+} , and Ca^{2+} neuronal and/or vascular channels in a receptor-independent manner. However, data on the receptor-independent endocannabinoid effects in human cardiac channels are scarce. Moreover, it has been proposed that in some pathologic situations, such as AF, EC synthesis is increased but there are no data regarding the expression of cannabinoid (CB) receptors in human myocardium or about the effects produced by the activation of the CB receptors on cardiac ion channels involved in the repolarization of human atrial APs.

Summary

Thus, it would be of interest to analyze the effects of endocannabinoids and endocannabinoid analogues on the Kv1.5 channels which generate the I_{Kur} and are critically involved in human atrial repolarization.

Therefore, the main objectives of this Doctoral Thesis were:

- a) To analyze the putative non-receptor mediated effects of EC and EC-related compounds [AEA, methanandamide (MetAEA), 2-arachidonoylglycerol (2-AG), L- α -lysophosphatidylinositol (LPI), oleoylethanolamide (OEA), stearoylethanolamide (SEA) and palmitoylethanolamide (PEA)] on Kv1.5 channels cloned from human cardiac tissue.
- b) To analyze the putative non-receptor mediated effects of the corresponding fatty acids from which ethanolamides are endogenously synthesized [arachidonic acid (AA), oleic acid (OA), stearic acid (SA), and palmitic acid (PA)] on Kv1.5 channels.
- c) To determine the expression levels of CB receptor type 1 (CB₁), type 2 (CB₂), and G protein-coupled receptor 55 (GPR55) in atrial samples obtained from patients in sinus rhythm (SR) and with chronic AF.
- d) To determine the effects produced by the activation of CB receptors on Kv1.5 channels.
- e) To analyze the non-receptor and receptor mediated effects of the EC on I_{Kur} recorded in human atrial myocytes.

RESULTS

We first studied the non-receptor mediated effects of AEA, its metabolically stable analogue MetAEA, 2-AG, and LPI, on Kv1.5 currents ($I_{hKv1.5}$) recorded in mouse fibroblasts (*Ltk* cells) by using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique.

AEA slightly decreased the peak current amplitude and induced a fast falling phase of current decay without modifying the slow process of inactivation resulting in a reduction of the amplitude at the end of the pulse to +60 mV of $49.4 \pm 4.1\%$. Moreover, AEA slowed the time course of tail current decay. MetAEA and 2-AG, but not LPI, produced similar effects to those observed with AEA, i.e. they reduced $I_{hKv1.5}$ by $39.0 \pm 4.1\%$ and $46.1 \pm 4.3\%$, respectively, and slowed the tail current decay. Interestingly, this inhibition was reproduced in the presence of CB₁ (rimonabant) and CB₂ (AM630) selective antagonists, supporting the hypothesis that the blockade was independent on the interaction with CB receptors.

Next, the effects of the fatty acids PA, SA, OA and AA as well as that of their respective ethanolamides PEA, SEA and OEA at 1 μ M were studied. AA, OEA, OA, and SA decreased

Summary

$I_{hKv1.5}$ at the end of the pulses at +60 mV by $32.0\pm2.1\%$, $29.8\pm4.7\%$, $75.7\pm1.6\%$, and $31.9\pm2.8\%$, respectively, and slowed the time course of current deactivation. In contrast, the effects of SEA and PEA and PA on the current amplitude and kinetics did not reach statistical significance.

Representation of the relative current as a function of the membrane potential, demonstrated that the EC-induced blockade steeply increased in the voltage range coinciding with that of channel opening (between +20 and 0 mV), remaining constant at more positive potentials.

We obtained the concentration-response curves for the endocannabinoids, the ethanolamides, and the fatty acids tested, by plotting the reduction of $I_{hKv1.5}$ at +60 mV as a function of the concentrations of each compound. The Hill equation was fitted to the data and the IC_{50} values were calculated. Among the endocannabinoids, the AA derivatives AEA and 2-AG exhibited the highest potency, yielding IC_{50} values of 0.9 ± 0.1 and 2.5 ± 0.2 μ M, respectively. Blockade obtained in the presence of the highest concentration of PEA and LPI was below 40%, which impaired the fitting of the data to the Hill equation. When comparing the potency of the fatty acids, the results demonstrated that OA and AA are the most potent while PA and SA are the least potent at inhibiting $I_{hKv1.5}$. The results support that in all the cases, the ethanolamide is less potent than its corresponding fatty acid, excluding AEA and AA, which displayed the same potency. Moreover, with the exception of OA, when the number of carbons in the fatty acyl chain increases, the potency of block also increases.

To get a deeper insight into the mechanism responsible for the non-mediated effects of AEA on Kv1.5 channels, we compared the blockade produced by AEA when it was added extra- or intracellularly. The results suggested that the blockade was produced as a consequence of the AEA interaction with the extracellular face of the channel. Therefore, we next studied the putative competition between AEA and TEA for this extracellular binding site. The presence of TEA significantly reduced the blockade produced by AEA, suggesting that both TEA and AEA compete for the same binding site on hKv1.5 channels. In these channels, TEA sensitivity is determined by R487, a residue located at the external entryway of the pore. Thus, the AEA effects on R487Y channels were also analysed. AEA inhibited the current generated by R487Y channels only by $14.5\pm6.4\%$ at +60 mV, a reduction significantly lower than that produced in WT channels. Furthermore, R487Y mutation also significantly decreased the 2-AG blockade.

AEA also inhibited I_{Kur} recorded in human atrial myocytes. These experiments were developed in the presence of CB₁ (rimonabant) and CB₂ (AM630) receptor antagonists and,

Summary

thus, suggested that AEA effects were receptor-independent. We next studied its effects on the AP characteristics recorded using microelectrode techniques in left mouse atria. AEA did not modify the resting membrane potential or the AP amplitude, whereas it significantly lengthened the APD.

Afterwards we determined by PCR the expression of CB₁, CB₂ and GPR55 receptors in human atrial samples obtained from patients in SR and with chronic AF. CB receptors were expressed in human atrial appendages and chronic AF markedly and significantly increased their expression.

The next group of experiments was performed in cells stably expressing CB₁ (CHO-CB₁) or GPR55 (CHO-GPR55) receptors. These cells were transiently transfected with the gene encoding human cardiac Kv1.5 and currents were recorded using the whole-cell patch-clamp technique. CB₁ and GPR55 receptors were stimulated with WIN55,212-2 and with LPI and PEA, respectively.

WIN55,212-2 1 μ M inhibited $I_{hKv1.5}$ in CHO-CB₁ cells by $40.5 \pm 2.3\%$ without modifying the time course of tail current decay. However, when studying WIN55,212-2 effects on hKv1.5 channels transfected in cells that do not express CB₁ receptors we obtained the same results, indicating that the previously observed effects were likely due to a direct interaction of WIN55,212-2 with the channel rather than CB₁ activation.

GPR55 receptor activation inhibited $I_{hKv1.5}$ in a concentration-dependent manner. LPI and PEA produced a more marked $I_{hKv1.5}$ inhibition by activating GPR55 receptors than that produced when they directly interacted with the channel protein. Moreover, they slowed the time course of deactivation. These results suggested that $I_{hKv1.5}$ can be modulated by GPR55 activation. Finally, we studied the effects of GPR55 activation on native I_{Kur} recorded in human atrial myocytes. Surprisingly neither LPI nor PEA significantly inhibited I_{Kur} at any of the potentials tested, indicating that in human myocytes GPR55 activation does not modulate the current generated by Kv1.5 channels.

CONCLUSIONS

In this Doctoral Thesis we have demonstrated that AEA, 2-AG and MetAEA, but not LPI and PEA, produced a non-receptor mediated blockade of human cardiac Kv1.5 channels transiently transfected in a mammalian cell line. Fatty acids also blocked hKv1.5 channels, the order of potency being PA < SA < AA < OA.

Blockade of these channels produced by EC is due to their direct interaction with the

Summary

external side of the channel, being a positively charged residue (R487) critical for this effect.

Data obtained in human atrial myocytes demonstrated that AEA inhibited native I_{Kur} in a non-receptor mediated manner, thus confirming the results obtained in cell lines transfected with Kv1.5 channels. Moreover, AEA also prolonged the APD recorded in mouse atria.

We also have demonstrated that CB receptors are expressed in human atrial appendages and that chronic AF markedly increased their expression.

CB₁ and GPR55 activation inhibited $I_{hKv1.5}$ recorded in CHO cells but did not inhibit native I_{Kur} in human atrial myocytes.

Overall, we propose that ECs modulate Kv1.5 channels, which generate human cardiac I_{Kur} and, therefore, modulate atrial AP morphology. This latter effect could be particularly interesting in situations in which EC synthesis is increased or in which the level of expression of CB receptors is increased, such as in AF.

Resumen

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La fibrilación auricular (FA) es la arritmia con mayor prevalencia en la población general. Datos recientes señalan que un 4.4% de la población española mayor de 40 años sufre esta patología alcanzando más de un 17% en los mayores de 80 años. También es la arritmia que más hospitalizaciones y gastos sanitarios origina.

La FA, *per se*, altera/remodela las propiedades electrofisiológicas, estructurales y contráctiles del tejido auricular de manera que promueve la ocurrencia y persistencia de la propia arritmia. Este fenómeno se denomina “remodelado auricular”. El remodelado eléctrico consiste principalmente en un acortamiento no uniforme tanto de la duración del potencial de acción (DPA) como del periodo refractario efectivo auricular (PREA), lo que permite la coexistencia de múltiples y desordenados frentes de onda de excitación en la aurícula. El acortamiento de la DPA y del PREA se debe a cambios en la expresión de los canales iónicos que participan en el potencial de acción (PA) auricular. En el miocardio auricular humano, la altura y duración de la fase de meseta del PA están determinadas por el equilibrio entre la corriente de entrada de Ca^{2+} tipo L (I_{CaL}) y dos corrientes de salida de K^+ , el componente sensible a 4-aminopiridina de la corriente transitoria (I_{to1}) y el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía (I_{Kur}). Esta última corriente es generada por los canales Kv1.5 , y no está presente en el ventrículo humano por lo que representa una posible diana para modular selectivamente la DPA auricular.

El sistema endocannabinoide (ECS) es un sistema modulador capaz de regular los sistemas nervioso, inmune y endocrino aunque sus efectos también pueden afectar a otros sistemas como el cardiovascular. Los endocannabinoides (EC) y análogos de endocannabinoides son sintetizados a demanda a partir de precursores lipídicos de las membranas celulares de básicamente todos los tipos celulares tanto del cerebro como de tejidos periféricos, incluido el miocardio, donde modulan la contractilidad y frecuencia cardíacas y donde ejercen efectos cardioprotectores y antiarrítmicos en modelos de isquemia reperusión.

Muchas de las funciones fisiológicas atribuidas a la anandamida (AEA), incluyendo modulación de la excitación neuronal, dolor y efectos cardiovasculares, son en parte independientes de la activación de los receptores cannabinoides (CB). De hecho, se ha demostrado que los EC y análogos de EC son capaces de modular propiedades funcionales de canales de Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} neuronales y/o vasculares de una manera independiente de receptor. No obstante apenas hay datos sobre los efectos no mediados a través de receptor de

los EC sobre los canales cardiacos humanos. Además se ha propuesto que en determinadas situaciones patológicas, como la FA, la síntesis de EC aumenta pero no hay datos sobre la expresión de los receptores CB en el miocardio humano o sobre los efectos de la activación de dichos receptores sobre los canales iónicos cardiacos involucrados en la repolarización del PA auricular.

Por lo tanto, sería de interés analizar los efectos de los EC y análogos de EC sobre los canales Kv1.5, responsables de generar la corriente nativa I_{Kur} y que están involucrados en la repolarización auricular humana.

Por todo ello, los objetivos que nos propusimos en la presente Tesis Doctoral fueron:

- a) Analizar los efectos directos de los EC y análogos de EC [AEA, metanandamida (MetAEA), 2-araquidonoilglicerol (2-AG), L- α -lisofosfatidilinositol (LPI), oleoiletanolamida (OEA), estearoiletanolamida (SEA) y palmitoiletanolamida (PEA)] sobre los canales humanos Kv1.5, expresados en líneas celulares de mamífero.
- b) Analizar los efectos directos de los ácidos grasos a partir de los cuales se sintetizan las etanolamidas [ácido araquidónico (AA), ácido oleico (AO), ácido esteárico (AS) y ácido palmítico (AP)] sobre los canales Kv1.5.
- c) Analizar la expresión de receptores CB₁, CB₂ y GPR55 en muestras de tejido auricular humano obtenidas de pacientes en ritmo sinusal (RS) y con FA crónica.
- d) Analizar los efectos de la activación de los receptores CB sobre los canales humanos Kv1.5, expresados en líneas celulares de mamífero.
- e) Analizar los efectos directos y mediados a través de receptor de los EC sobre la corriente nativa I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos.

RESULTADOS

En primer lugar estudiamos los efectos directos de la AEA, su análogo no hidrolizable MetAEA, 2-AG y LPI sobre las corrientes Kv1.5 ($I_{hKv1.5}$) registradas en fibroblastos de ratón (células *Ltk*) mediante la técnica de patch-clamp en su configuración de célula entera.

La AEA redujo ligeramente la amplitud del pico de corriente e indujo una fase rápida de caída de la corriente sin modificar el proceso de inactivación, lo que disminuyó la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +60 mV en un 49.4±4.1%. Además, la AEA retrasó significativamente la cinética del proceso de deactivación. La MetAEA y el 2-AG pero no el LPI, produjeron efectos similares a los observados con la AEA, inhibieron la $I_{hKv1.5}$ un 39.0±4.1% y un 46.1±4.3%, respectivamente. Esta inhibición se reprodujo en presencia de los

Resumen

antagonistas selectivos de receptores CB₁ (rimonabant) y CB₂ (AM630), apoyando la hipótesis de que el bloqueo era independiente de la interacción de los compuestos con sus receptores.

A continuación estudiamos los efectos de los ácidos grasos AP, AS, AO y AA así como los de sus respectivas etanolamidas PEA, SEA y OEA a la concentración de 1 μ M. AA, OEA, OA y AS inhibieron la $I_{hKv1.5}$ medida al final del pulso a +60 mV en un 32.0 \pm 2.1%, 29.8 \pm 4.7%, 75.7 \pm 1.6% y 31.9 \pm 2.8%, respectivamente, y retrasaron el curso temporal de la deactivación. Por el contrario los efectos de la SEA, la PEA y el AP sobre la amplitud de la corriente y las cinéticas de deactivación no alcanzaron significación estadística.

La representación de la corriente relativa en función del potencial de membrana demostró que el bloqueo producido por los EC aumentaba marcadamente en el rango de potenciales a los que se produce la apertura del canal (entre +20 y 0 mV), permaneciendo constante a potenciales más positivos.

A continuación obtuvimos las curvas concentración-respuesta obtenidas al representar la disminución de la $I_{hKv1.5}$ medida al final del pulso a +60 mV en función de las distintas concentraciones empleadas de EC, etanolamidas y ácidos grasos. El ajuste de la ecuación de Hill permitió obtener los valores de CE₅₀. Entre los EC, los derivados del AA como la AEA y el 2-AG fueron los más potentes, con valores de CE₅₀ de 0.9 \pm 0.1 y 2.5 \pm 0.2 μ M, respectivamente. Al comparar la potencia de los ácidos grasos, los resultados demostraron que el AO y el AA fueron los más potentes mientras que el AP y el AS fueron los menos potentes para inhibir la $I_{hKv1.5}$. En todos los casos se observó que la etanolamida era menos potente que su correspondiente ácido graso, salvo la AEA y el AA que poseían una potencia similar. Además, con la excepción del AO, a medida que el número de átomos de carbono de la cadena de acilo aumentaba, la potencia de bloqueo también aumentaba.

Para profundizar en el mecanismo responsable de los efectos directos de la AEA sobre los canales Kv1.5, comparamos el bloqueo producido por la AEA cuando era aplicada extra- o intracelularmente. Los resultados sugerían que el bloqueo se producía como consecuencia de la interacción de la AEA con la cara extracelular del canal. Por lo tanto, a continuación estudiamos la posible competición de la AEA con el tetraetilamonio (TEA) por el sitio de unión extracelular. La presencia de TEA redujo significativamente el bloqueo producido por la AEA lo que indicaba que ambos compuestos competían por el mismo sitio de unión de los canales Kv1.5. En estos canales la sensibilidad al TEA viene determinada por el residuo R487, localizado en la entrada del poro del canal. Por ello los efectos de la AEA sobre los canales R487Y también fueron estudiados. La AEA inhibió la corriente generada por los

Resumen

canales R487Y en tan sólo un $14.5 \pm 6.4\%$ a $+60$ mV, una reducción significativamente menor que la que producía en los canales WT. Es más, la mutación R487Y también disminuyó significativamente el bloqueo producido por el 2-AG.

La AEA también inhibió la I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos. Estos experimentos se llevaron a cabo en presencia de los antagonistas de los receptores CB₁ (rimonabant) y CB₂ (AM630) y por lo tanto implicaban que los efectos de la AEA eran independientes de receptor. Por último estudiamos los efectos de la AEA en las características del PA registrado en preparaciones de aurícula izquierda de ratón mediante técnicas convencionales de registro de PA con microelectrodos de vidrio. La AEA no modificó ni el potencial de reposo ni la amplitud del PA pero sin embargo prolongó la DPA medida al 20%, 50% y 90% de la repolarización.

Después determinamos por PCR la expresión de los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 en muestras auriculares humanas obtenidas de pacientes en RS y con FA crónica. Los receptores se expresaban en las orejuelas auriculares y además la FA crónica aumentaba marcadamente la expresión de todos ellos.

El siguiente grupo de experimentos se realizó en células que expresaban de manera estable el receptor CB₁ (CHO-CB1) y GPR55 (CHO-GPR55). Estas células fueron transfectadas transitoriamente con el gen que codifica para los canales cardiacos humanos Kv1.5 y las corrientes se registraron con la técnica del patch-clamp en su configuración de célula entera. Los receptores CB₁ y GPR55 se estimularon con sus respectivos agonistas, WIN55,212-2 para CB₁ y LPI y PEA para GPR55.

WIN55,212-2 $1 \mu\text{M}$ inhibió la $I_{hKv1.5}$ en células CHO-CB1 en un $40.5 \pm 2.3\%$ sin modificar la cinética del proceso de deactivación. Sin embargo, obtuvimos los mismos resultados al estudiar los efectos del WIN55,212-2 sobre los canales Kv1.5 expresados en células que carecen de receptor, lo que indicaba que los efectos observados anteriormente se debían a una interacción directa del WIN55,212-2 con el canal más que a la activación de los receptores CB₁.

La activación del receptor GPR55 inhibió de manera concentración dependiente la $I_{hKv1.5}$. LPI y PEA produjeron una inhibición más marcada de la $I_{hKv1.5}$ activando a los receptores GPR55 que la que producían interaccionando directamente con las proteínas que forman los canales. Estos resultados sugerían que la $I_{hKv1.5}$ puede ser modulada por la activación de los receptores GPR55. Finalmente estudiamos los efectos de la estimulación de estos receptores sobre la I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos. Sorprendentemente ni el LPI ni la

PEA inhibieron la I_{Kur} a ninguno de los potenciales estudiados, indicando que la activación de los receptores GPR55 no modula la corriente nativa en miocitos auriculares humanos.

CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral hemos demostrado que la AEA, el 2-AG y la MetAEA, pero no el LPI ni la PEA, bloqueaban de manera independiente de receptor los canales humanos cardiacos Kv1.5 transfectados transitoriamente en líneas celulares de mamífero. Los ácidos grasos también bloqueaban los canales Kv1.5, siendo el orden de potencia $AP < AS < AA < AO$.

El bloqueo de estos canales producido por los EC se debía a la interacción directa del compuesto con la cara externa del canal, siendo el residuo cargado positivamente R487 crítico para este efecto.

Los datos obtenidos en miocitos auriculares humanos demostraron que la AEA inhibía la corriente nativa I_{Kur} de manera independiente de receptor, confirmando por tanto los resultados obtenidos en líneas celulares transfectadas con los canales Kv1.5. Además, la AEA también prolongó la DPA registrado en aurícula izquierda de ratón.

También hemos demostrado que los receptores CB se expresaban en muestras de orejuela auricular humana y que la FA crónica aumentaba marcadamente su expresión.

La activación de los receptores CB₁ y GPR55 inhibía la $I_{hKv1.5}$ registrada en células CHO pero no inhibía la corriente nativa I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos.

Por todo ello, proponemos que los EC modulan los canales Kv1.5, responsables de generar la corriente cardíaca humana I_{Kur} y, por lo tanto, modularían la morfología del PA auricular. Este último efecto sería de particular importancia en situaciones en las que o bien la síntesis de EC o bien el nivel de expresión de receptores CB esté aumentado, como bien podría ser el caso de la FA.

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDÍACA	3
1.1. Excitabilidad	4
1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular	6
1.1.2. El potencial de acción cardíaco.....	8
1.1.2.a. PA rápidos o dependientes de Na^+	9
1.1.2.b. PA lentos o dependientes de Ca^{2+}	12
1.2. Automatismo	13
1.3. Refractariedad.....	14
1.4. Propagación del impulso cardíaco	15
2. CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE IMPLICADOS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDÍACO	17
2.1. Canales de Na^+	17
2.1.1. Estructura de los canales de Na^+	18
2.1.2. Características de la I_{Na}	20
2.1.3. Canalopatías asociadas a los canales de Na^+ cardíacos	22
2.2. Canales de Ca^{2+}	22
2.2.1. Estructura de los canales de Ca^{2+}	23
2.2.2. Características de la $I_{\text{Ca,L}}$	25
2.2.3. Composición de los canales que generan la $I_{\text{Ca,L}}$	27
2.2.4. Canalopatías asociadas al canal de Ca^{2+} tipo L.....	27
2.3. Canales de K^+	28
2.3.1 Canales 2TM/IP.....	30
2.3.1.a La rectificación interna en los canales K_{ir}	31
2.3.1.b Estructura cristalográfica de los canales 2TM/IP	33
2.3.1.c Principales canales 2TM/IP cuyas corrientes intervienen en el PA cardíaco.....	34
I. La I_{K1}	34
I.a. Características de la I_{K1}	35
I.b. Composición de los canales que generan la I_{K1}	36
II. La $I_{\text{K,ATP}}$	37
II.a. Composición de los canales que generan la $I_{\text{K,ATP}}$	37
III. La $I_{\text{K,ACh}}$	38

Índice

III.a. Características de la $I_{K_{ACh}}$	38
III.b. Composición de los canales que generan la $I_{K_{ACh}}$	39
2.3.2. Canales 4TM/2P	40
2.3.3. Canales 6TM/1P	41
2.3.3.a. Estructura de los canales K_v	43
I. La subunidad α	45
II. Subunidades auxiliares	48
2.3.3.b. La inactivación de los canales K_v	51
2.3.3.c. Principales corrientes generadas a través de canales K_v que intervienen en el PA cardíaco	53
I. La I_{to}	54
I.a. Características de la I_{to1}	54
I.b. Composición de los canales que generan la I_{to1}	55
I.c. La I_{to1} en diversas patologías	56
II. La I_{Kur}	57
II.a. Características de la I_{Kur}	58
II.b. Composición de los canales que generan la I_{Kur}	61
II.c. Regulación de la I_{Kur}	63
II.d. Propiedades farmacológicas de la I_{Kur}	64
II.e. Papel de la I_{Kur} en la fibrilación auricular	67
III. La I_{Kr}	72
III.a. Características de la I_{Kr}	73
III.b. Composición de los canales que generan la I_{Kr}	73
III.c. La I_{Kr} en diversas patologías	74
III.d. Canalopatías asociadas a las subunidades $Kv11.1$ y $MiRP1$	74
IV. La I_{Ks}	76
IV.a. Características de la I_{Ks}	76
IV.b. Composición de los canales que generan la I_{Ks}	77
IV.c. Canalopatías y patologías asociadas a las subunidades $Kv7.1$ y $MinK$	78
3. FIBRILACIÓN AURICULAR	79
3.1. Génesis de la FA	80
3.2. Causas y condiciones asociadas a la FA	83
3.3. Remodelado en la FA	84

3.3.1. Remodelado eléctrico	85
3.3.2. Remodelado estructural y contráctil	88
3.4. Tratamiento farmacológico de la FA.....	89
4. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE.....	91
4.1. Endocannabinoides y análogos.....	91
4.2. Síntesis, transporte y degradación de los endocannabinoides	95
4.3. Receptores endocannabinoides.....	98
4.3.1. Receptores no-CB1/no-CB2 o receptores <i>CB-like</i>	101
4.4. Acciones de los endocannabinoides	104
4.4.1. Acciones cardiovasculares de los endocannabinoides	104
4.4.2. Efectos de los endocannabinoides sobre diversos canales iónicos.....	107
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	111
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	115
1. TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE EN PARCHE DE MEMBRANA (PATCH-CLAMP).....	117
2. REGISTRO DE $I_{hKv1.5}$ EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGOS	120
2.1. Células <i>Ltk</i> ⁻	120
2.1.1. Cultivo y transfección de los canales hKv1.5 en células <i>Ltk</i> ⁻	120
2.2. Células CHO.....	121
2.2.1. Cultivo y transfección de los canales hKv1.5 en células CHO.....	122
2.3. Técnicas de registro en sistemas de expresión heterólogos.....	123
2.3.1. Registro de $I_{hKv1.5}$: Soluciones y protocolos experimentales	124
2.3.2. Análisis de los registros de $I_{hKv1.5}$	125
3. REGISTRO DE LA CORRIENTE I_{Kur} EN MIOCITOS AURICULARES HUMANOS.....	126
3.1. Disociación de miocitos auriculares humanos.....	126
3.2. Técnicas de registro de la I_{Kur} auricular humana	128
3.2.1. Registro de la I_{Kur} : Soluciones y protocolos experimentales	129
4. REGISTRO DE PA CARDÍACOS EN PREPARACIONES AURICULARES MULTICELULARES.....	129

4.1. Preparaciones auriculares multicelulares.....	129
4.2. Técnicas de registro de PA auriculares.....	130
5. COMPUESTOS Y SOLUCIONES.....	130
6. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE COMPLEJIDAD.....	131
7. MEDIDAS DE ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO Y CON RESOLUCIÓN TEMPORAL.....	131
8. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES CB EN CÉLULAS DE CULTIVO Y EN MUESTRAS AURICULARES HUMANAS.....	133
8.1. Células <i>Ltk</i> ⁻	133
8.2. Muestras auriculares humanas.....	134
8.2.1. RT-PCR.....	134
8.2.2. RT-qPCR.....	135
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS RESULTADOS.....	136
IV. RESULTADOS	137
1. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LA $I_{hKv1.5}$	139
2. EFECTOS DIRECTOS DE LOS ENDOCANNABINOIDES Y ANÁLOGOS DE CANNABINOIDES SOBRE LOS CANALES hKv1.5.....	140
2.1. Efectos de la AEA y la MetAEA sobre los canales hKv1.5.....	140
2.1.1. Implicación de los receptores CB en los efectos de la AEA sobre la $I_{hKv1.5}$	145
2.2. Efectos del 2-AG y del LPI sobre los canales hKv1.5	147
2.3. Efectos de la PEA, la SEA y la OEA sobre los canales hKv1.5	150
2.4. Efectos de los ácidos grasos AP, AS, AO y AA sobre los canales hKv1.5.....	153
2.5. Comparación de los efectos de los compuestos estudiados y relación estructura actividad	157
2.6. Efectos directos de la AEA sobre la corriente auricular humana I_{Kur}	159
2.7. Efectos directos de la AEA sobre los PAs auriculares de ratón	160
3. MECANISMOS DE BLOQUEO DE LOS ENDOCANNABINOIDES SOBRE LOS CANALES hKv1.5	161
3.1. Modificaciones en las propiedades dinámicas y estructurales de la membrana producidas por los endocannabinoides.....	161

3.2. Implicación del calcio intracelular y de la proteína quinasa C en los efectos de la AEA	165
3.3. Los endocannabinoides interaccionan con la parte extracelular de los canales hKv1.5	167
4. EFECTOS DE LOS ENDOCANNABINOIDES MEDIADOS A TRAVÉS DE RECEPTOR SOBRE LOS CANALES hKv1.5.....	172
4.1. Expresión del ARNm de receptores CB en muestras auriculares humanas	172
4.1.1. PCR semicuantitativa.....	173
4.1.2. PCR cuantitativa	174
4.2. Efectos de la estimulación selectiva del receptor CB ₁ sobre la $I_{hKv1.5}$	175
4.2.1. Efectos de la activación del receptor CB ₁ sobre la corriente auricular humana I_{Kur}	180
4.3. Efectos de la estimulación selectiva del receptor GPR55 sobre la $I_{hKv1.5}$	182
4.3.1. Efectos de la activación del receptor GPR55 sobre la corriente auricular humana I_{Kur}	186
V. DISCUSIÓN.....	189
1. EFECTOS DE LOS ENDOCANNABINOIDES SOBRE LOS CANALES hKv1.5 Y LA I_{Kur}	191
2. DETERMINACIÓN DEL POSIBLE SITIO DE UNIÓN DE LOS ENDOCANNABINOIDES AL CANAL hKv1.5	195
3. EFECTOS DE LOS ENDOCANNABINOIDES Y ANÁLOGOS MEDIADOS A TRAVÉS DE LA ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES CB SOBRE LA $I_{hKv1.5}$ Y LA I_{Kur}.....	196
3.1. Modulación de la $I_{hKv1.5}$ y de la I_{Kur} a través de la estimulación del receptor CB ₁	197
3.2. Efectos del LPI y la PEA mediados a través del receptor GPR55 sobre la $I_{hKv1.5}$ y la I_{Kur}	198
4. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LOS RESULTADOS.....	199
4.1. El SCE en diferentes situaciones patológicas.....	199
4.2. Modulación del SCE en la FA	201
4.3. Implicaciones de la inhibición de la I_{Kur} en pacientes con FA	202

Índice

VI. CONCLUSIONES	205
-------------------------------	------------

VII. BIBLIOGRAFÍA.....	209
-------------------------------	------------

Abreviaturas	263
---------------------------	------------

Publicaciones.....	269
---------------------------	------------

I. INTRODUCCIÓN

1. ELECTROFISIOLOGÍA CARDÍACA

El corazón es un órgano que actúa a modo de bomba, enviando sangre a los distintos tejidos del organismo. Para llevar a cabo su función presenta tejidos especializados en los que se generan automáticamente impulsos que se conducen de forma organizada y provocan la contracción periódica del miocardio. El corazón está formado por dos tipos de músculo: el auricular y el ventricular, de los que depende su capacidad contráctil, y las fibras del tejido especializado de conducción, encargadas de la transmisión de los impulsos a través del corazón.

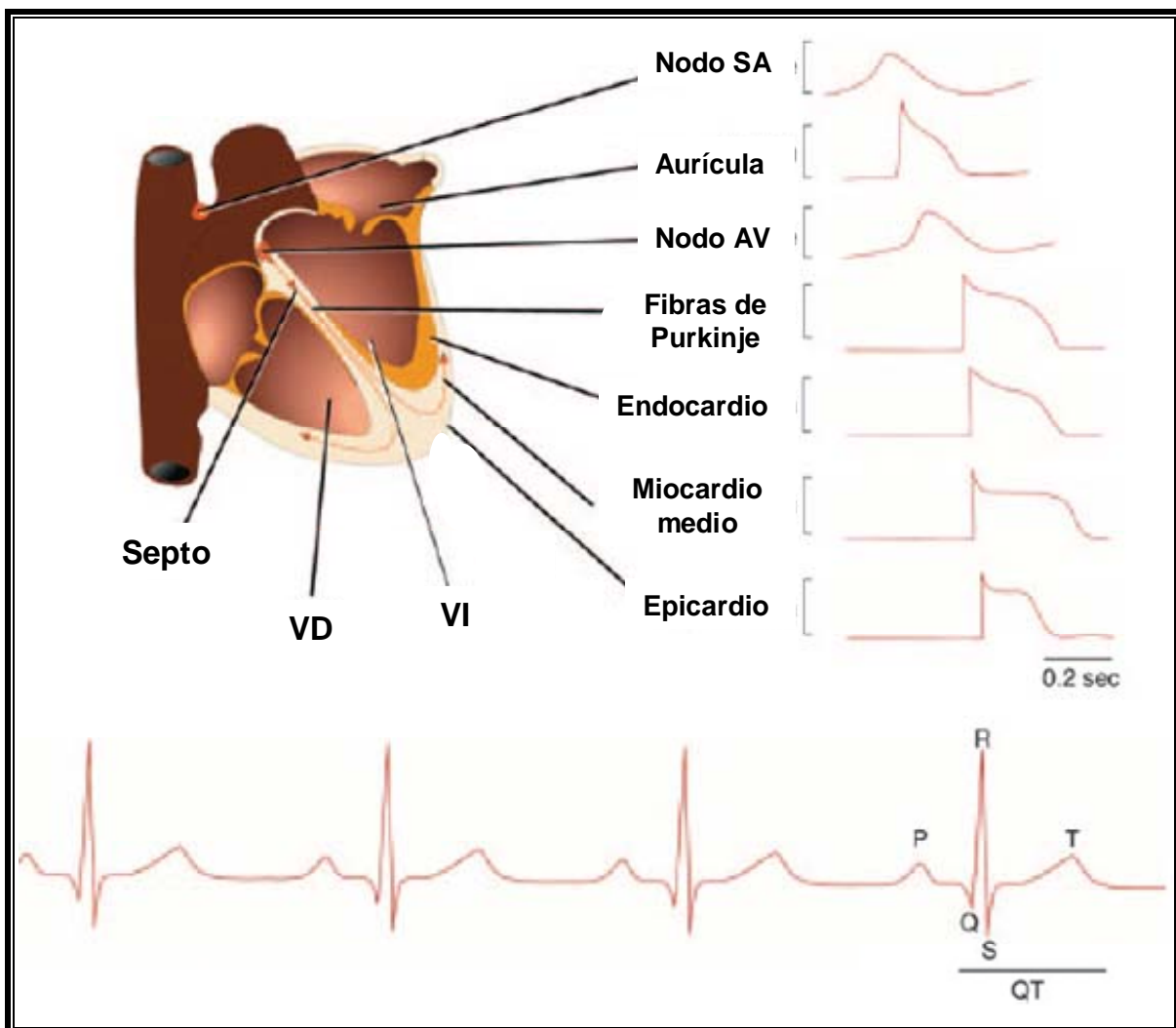


Figura I.1. Representación esquemática de la actividad eléctrica en el miocardio. Se observan los potenciales de acción registrados en diversas zonas del tejido cardíaco y su correlación con el electrocardiograma de superficie. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

En condiciones fisiológicas, el impulso cardíaco nace en el nodo senoauricular (SA), estructura que se localiza en la confluencia de la vena cava superior con la orejuela derecha y la pared lateral de la aurícula derecha (Figura I.1). El nodo SA genera unos 60-90 potenciales

de acción (PA) por minuto que se propagan sin disminución de amplitud hasta que todas las células cardíacas son excitadas. Desde el nodo SA, el impulso se propaga por todo el tejido auricular a una velocidad de 0.3 m/s para, a continuación, llegar al nodo aurículo-ventricular (AV), única vía que permite la comunicación eléctrica entre aurículas y ventrículos en condiciones fisiológicas. En el nodo AV, el estímulo se ralentiza antes de pasar al ventrículo (0.01-0.05 m/s). El impulso pasa después a las fibras de transición y al sistema de His-Purkinje, a través del cual se conduce muy rápidamente (2-4 m/s). El haz de His se bifurca en una rama derecha y varias izquierdas, que acaban ramificándose profusamente en fibras de Purkinje, desde donde la activación se extiende por el músculo ventricular, empezando por el septo medio izquierdo y la base de los músculos papilares y, de ahí, al resto de los ventrículos. La rápida velocidad de conducción intraventricular (0.3-4 m/s) tiene como misión permitir que ambos ventrículos se contraigan de forma sincrónica en un corto espacio de tiempo, algo esencial para que se realice de forma eficaz la función de bomba (Hoffman y Cranefield, 1960; Delpón y Tamargo, 2010).

Para comprender este complejo mecanismo, que se repite con cada latido, es necesario conocer algunas propiedades de las células cardíacas tales como la excitabilidad, el automatismo, la refractariedad y la conducción del impulso cardíaco.

1.1. Excitabilidad

La membrana citoplásmica es una barrera que separa dos medios acuosos de diferente composición. Esta diferencia en la composición origina un gradiente de concentración que induce la difusión de moléculas desde el medio donde están más concentradas hacia el medio en el que lo están menos (Tabla I.1). Termodinámicamente, la difusión es un proceso que disminuye el orden del sistema (es decir, que aumenta su entropía), lo que implica que la difusión libera energía. Nernst cuantificó esta energía como una variación de potencial eléctrico:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.1)$$

donde ΔG es la energía de Gibbs liberada en el proceso de difusión, R es la constante universal de los gases (8.31 J/mol·K), T es la temperatura absoluta y $[ion]_e$ e $[ion]_i$ son las concentraciones extra e intracelulares del ion que difunde (Nernst, 1888). Así, si la membrana es únicamente permeable al K^+ , éste difundirá desde el interior (donde está más

Introducción

concentrado) hacia el exterior de la célula (donde está menos concentrado), por lo que el interior se tornará más negativo, con lo que volverá a atraer iones K^+ hacia el interior de la célula. La energía de atracción también puede cuantificarse:

$$\Delta G = -E \cdot z \cdot F \quad (I.2)$$

donde E es el potencial transmembrana, z es la valencia del ion en cuestión y F es la constante de Faraday ($9.65 \cdot 10^4$ C/mol). Con la salida progresiva de K^+ de la célula llega un punto en el que el gradiente eléctrico se iguala al gradiente químico (de concentración) que causa la difusión:

$$E \cdot z \cdot F = R \cdot T \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.3)$$

Reordenando los términos de la igualdad, se obtiene la “ecuación de Nernst” (Nernst, 1888):

$$E = (R \cdot T / z \cdot F) \cdot \ln([ion]_e/[ion]_i) \quad (I.4)$$

El potencial al que el flujo neto a través de la membrana de un ion es nulo recibe el nombre de “potencial de equilibrio” (Tabla I.1) y su valor viene dado por la ecuación de Nernst.

Ion	[Ion] _e (mM)	[Ion] _i (mM)	Potencial de equilibrio (mV)
Na ⁺	135-145	12	+67
K ⁺	3.5-5	155	-96
Cl ⁻	123	4.2	-90
Ca ²⁺	1.5	10 ⁻⁴ nM	+129

Tabla I.1. Concentraciones extra e intracelulares de los principales iones en condiciones fisiológicas. Los potenciales de equilibrio para cada ion se han obtenido mediante la ecuación de Nernst para una temperatura de 37°C.

La diferencia de potencial que existe a ambos lados de la membrana se denomina potencial de membrana (E_m) y viene determinada por la concentración de iones a uno y a otro lado de la misma, así como por la permeabilidad de la membrana a cada ion (Hoffman y Craneffeld, 1960). En condiciones normales, las células musculares auriculares y ventriculares presentan un E_m de aproximadamente -85 mV, mientras que en las células de los

nodos SA y AV el E_m es de entre -45 y -65 mV. En las células auriculares y ventriculares el valor del E_m se mantiene constante si la célula no se estimula. A esta diferencia de potencial se le denomina “potencial de reposo” (PR) y está determinado por el equilibrio entre la capacidad de los distintos iones para atravesar la membrana a favor de su gradiente de concentración y el transporte activo de dichos iones en contra de su gradiente.

Si la membrana de las células cardíacas sólo fuera permeable al K^+ , el PR debería alcanzar un valor similar al del potencial de equilibrio para el K^+ (E_K). Sin embargo, el valor del PR es menos negativo que el del E_K debido a que la membrana es además permeable a otros iones. Cuando una membrana es permeable a varios iones, el E_m depende de tres factores: la polaridad de la carga eléctrica de cada ion, la permeabilidad de la membrana (P) a cada ion y la concentración de estos iones a ambos lados de la membrana. Por tanto, la ecuación que define el E_m en las células permeables al Na^+ , al Cl^- y al K^+ , denominada “ecuación de campo constante” o “ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz” (Goldman, 1943; Hodgkin y Katz, 1949), es:

$$E_m = \left(\frac{RT}{Fz} \right) \ln \left[\frac{([K^+]_e P_K + [Na^+]_e P_{Na} + [Cl^-]_e P_{Cl})}{([K^+]_i P_K + [Na^+]_i P_{Na} + [Cl^-]_i P_{Cl})} \right] \quad (1.5)$$

donde P_K , P_{Na} y P_{Cl} representan la permeabilidad de la membrana al K^+ , al Na^+ y al Cl^- , respectivamente.

Pero, además, algunas células como las nerviosas y las musculares son excitables: son capaces de variar esta diferencia de potencial generando impulsos eléctricos (o PA) en respuesta a un estímulo mediante el intercambio de iones entre los medios intra y extracelular. En el miocardio, estos impulsos se propagan para convertirse en el factor determinante de la contracción rítmica del corazón. El control del intercambio iónico resulta además esencial para evitar una excesiva presión osmótica debida a los cambios en la osmolaridad de ambos medios.

1.1.1. Transporte de iones a través de la membrana celular

El Na^+ y el Ca^{2+} están más concentrados en el medio extracelular, mientras que el K^+ y los aniones orgánicos son los que predominan en el medio intracelular. El transporte de iones a través de la membrana se produce a favor de gradiente de concentración (sin gasto de energía) o en contra de gradiente (y, por lo tanto, con gasto energético) y requiere de sistemas especializados de transporte como los canales iónicos o las proteínas transportadoras.

Los canales iónicos son proteínas transmembrana (TM) cuyas principales funciones son:

- Formar poros hidrófilos a través de los cuales los iones atraviesan la membrana a favor de gradiente de concentración y de potencial eléctrico (gradiente electroquímico), permitiendo el paso de iones masivamente (hasta 10^8 iones/s) y generando una corriente iónica.
- Discriminar los iones que pasan a su través, gracias a un filtro de selectividad. El mecanismo de selectividad se basa tanto en el tamaño del ion en su forma hidratada como en su carga, de modo que ciertos residuos del canal se alinean en el poro e interaccionan con los iones formando barreras termodinámicas que favorecen el paso de unos iones frente a otros.
- Controlar la permeabilidad de la membrana a cada ion mediante la transición entre los diferentes estados del canal. Los cambios conformacionales de la proteína entre los distintos estados (abierto-conductor y cerrado e inactivo-no conductores) son lo que se denomina el *gating* del canal y se producen de forma muy rápida ($<10 \mu s$). Según el estímulo que origine estos cambios conformacionales, los canales se clasifican en canales dependientes de voltaje (dependen del E_m), canales activados por ligando (el proceso de apertura y cierre depende de la unión de moduladores externos como hormonas o neurotransmisores) y canales operados por segundos mensajeros (el *gating* está regulado por factores intracelulares como el Ca^{2+} o subunidades de proteínas G). En el caso de los canales dependientes de voltaje, la proteína presenta una serie de aminoácidos que se encuentran cargados a pH fisiológico y que se mueven en un campo eléctrico muy limitado y confinado en la bicapa lipídica de la membrana celular, originando unas corrientes que se denominan corrientes de *gating* (Armstrong y Bezanilla, 1973; Armstrong, 1974) y cuya magnitud es muy pequeña, ya que en este proceso se produce un desplazamiento de carga equivalente al movimiento lineal de $\approx 12-13$ electrones (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995).

Las proteínas transportadoras facilitan el movimiento de pequeñas moléculas a través de la membrana. Estas proteínas sólo pueden fijar una o unas pocas moléculas al mismo tiempo para transferirlas al otro lado de la membrana, por lo que la velocidad de transporte es más lenta que la de los canales iónicos (10^2-10^4 moléculas/s). Dentro de este grupo se encuentran proteínas como las bombas iónicas o los cotransportadores:

- Las bombas iónicas son enzimas de membrana que utilizan la energía liberada en la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) para transportar iones a través de la membrana en contra de gradiente en un proceso denominado “transporte activo”. Debido a su mecanismo, se denominan ATPasas.
- Los cotransportadores o intercambiadores, al igual que las bombas iónicas, trasladan moléculas en contra de su gradiente de concentración, aunque en este caso la energía que

alimenta el proceso procede de la difusión de otras moléculas, normalmente iones Na^+ . Si los iones Na^+ se mueven en la misma dirección que la molécula transportada se habla de un cotransportador, mientras que si se mueven en dirección contraria se habla de un intercambiador. Posteriormente, las ATPasas se encargan de restaurar el gradiente de Na^+ , por lo que a este proceso se le denomina “transporte activo secundario”.

1.1.2. El potencial de acción cardíaco

Las células cardíacas son excitables, es decir, cuando reciben un estímulo de intensidad suficiente para superar el potencial umbral son capaces de generar una respuesta eléctrica o PA que está acoplado a la respuesta contráctil. Por el contrario, cuando no se alcanza el potencial umbral, sólo se genera una respuesta local que no se propaga a las células colindantes: es un estímulo “todo o nada”. El PA es un cambio transitorio en la polaridad de la membrana resultante de múltiples cambios secuenciales en la permeabilidad de la misma a los diferentes iones y originado por un estímulo externo (la despolarización de células colindantes, neurotransmisores, la “distensión” celular [*stretch*], etc). La entrada de cargas positivas en la célula produce la despolarización, con lo que el interior de la célula va haciéndose más positivo (en su valor máximo, el potencial puede alcanzar valores cercanos a +40 mV), mientras que la salida de cargas positivas es responsable de la repolarización. Una vez finalizada la repolarización hay un breve periodo, denominado periodo refractario absoluto, en el que es imposible que un nuevo estímulo logre disparar un nuevo PA.

Parámetro	PA rápido	PA lento
Corriente despolarizante en la fase 0	I_{Na}	I_{Ca}
Potencial de reposo (mV)	-85 a -90	-45 a -65
Velocidad de conducción (m/s)	0.5-4	0.01-0.1
Amplitud del PA (mV)	100-130	40-85
Velocidad máxima de despolarización (mV/s)	200-1000	2-15
Factor de seguridad	Alto	Bajo
Se abole por	TTX, anestésicos locales, antiarrítmicos grupo I	Verapamilo, diltiazem, DHP, Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+}

Tabla I.2. Características de los PA rápidos y lentos. TTX: Tetrodotoxina. DHP: Dihidropiridinas.

En el corazón se registran PA de diversos tipos (Figura I.1). En las células auriculares y ventriculares y en las células del sistema de His-Purkinje la despolarización es debida a la rápida entrada de iones de Na^+ , mientras que en las células de los nodos SA y AV la

despolarización es debida a la lenta entrada de iones de Ca^{2+} . Por lo tanto, en el corazón existen células que generan PA rápidos o “dependientes de Na^{+} ” y células que generan PA lentos o “dependientes de Ca^{2+} ” (Tabla I.2) (Coraboeuf y Otsuka, 1956; Beeler y Reuter, 1977; Carmeliet y Vereecke, 1979).

1.1.2.a. PA rápidos o dependientes de Na^{+}

Los PA rápidos o dependientes de Na^{+} presentan 5 fases (Figura I.2) (Hoffman y Cranefield, 1960; Nattel, 2002; Delpón y Tamargo, 2010).

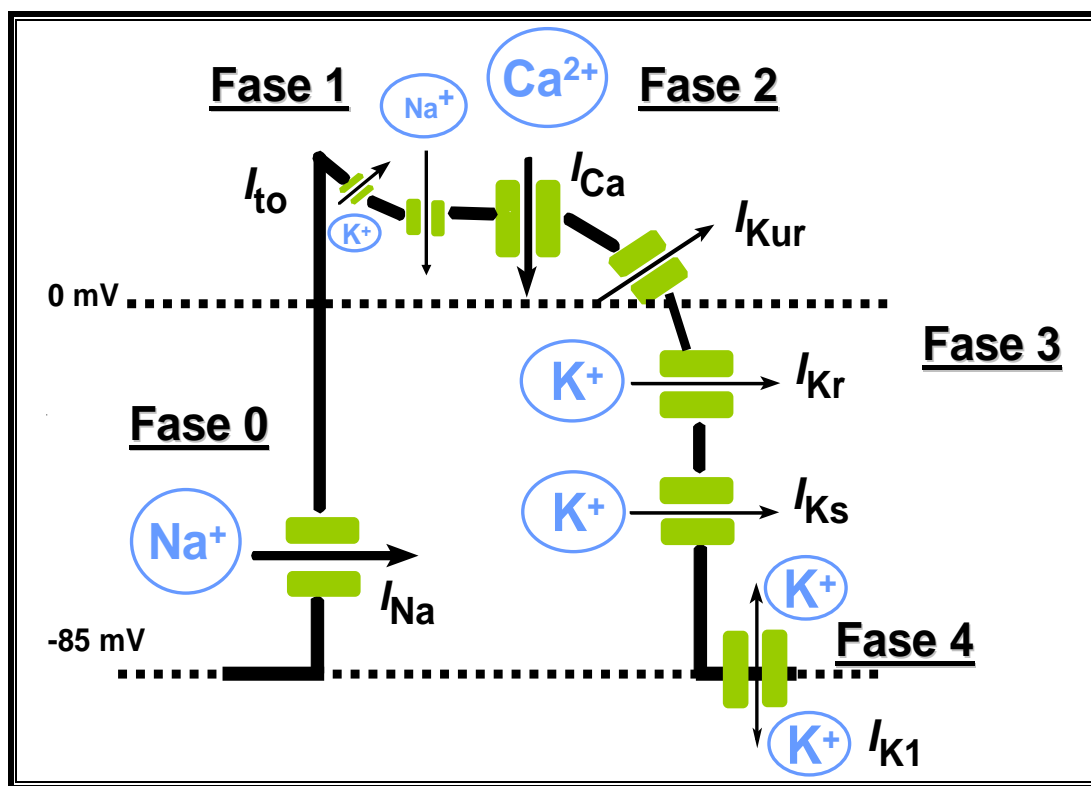


Figura I.2. PA auricular rápido o “dependiente de Na^{+} ”. Representación esquemática de las distintas fases del PA, con las corrientes iónicas de entrada y salida implicadas en el mismo.

La fase 0 de rápida despolarización de las células miocárdicas se debe a la apertura de los canales de Na^{+} dependientes de voltaje y, por lo tanto, a la activación de la corriente rápida de entrada de Na^{+} (I_{Na}), que desplaza el potencial de membrana desde sus valores en reposo (PR ≈ -85 mV) hasta valores positivos ($\approx +30$ mV). La activación de la I_{Na} es un proceso muy rápido (0.5-2 ms) y su inactivación sigue una cinética biexponencial, con un componente lento que se prolonga durante varios cientos de ms y que contribuye al mantenimiento de la fase 2 del PA. La magnitud de la I_{Na} determina la amplitud, la velocidad máxima de despolarización del PA y, por lo tanto, la velocidad de conducción intracardiaca (Hondeghe,

1978; Walton y Fozzard, 1979; Hille, 2001). A continuación, comienza la repolarización celular, en la que se distinguen 3 fases.

La fase 1 de rápida repolarización es consecuencia de la inactivación de la I_{Na} (paso del canal a una conformación no conductora) y de la activación de dos corrientes de salida de K^+ dependientes de voltaje: a) la corriente transitoria (I_{tot1}), que se activa e inactiva rápidamente y que juega un papel fundamental en el control de la duración del PA (DPA) sobre todo a nivel auricular y del epicardio ventricular (Boyett, 1981; Josephson y cols., 1984; Giles e Imaizumi, 1988; Shibata y cols., 1989) y b) el componente ultrarrápido de la corriente rectificadora tardía, de rápida activación y lenta inactivación (I_{Kur}), que es específicamente auricular (Fedida y cols., 1993; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Tamargo y cols., 2009).

La fase 2 (o fase de meseta) representa el delicado equilibrio entre dos corrientes de entrada, la I_{Na} (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Gintant y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985) y la corriente de entrada de Ca^{2+} tipo L ($I_{Ca,L}$) (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989; Bers y Pérez-Reyes, 1999), y tres corrientes rectificadoras tardías de salida de K^+ de activación ultrarrápida, rápida y lenta (I_{Kur} , I_{Kr} e I_{Ks} , respectivamente) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991; Wang y cols., 1993 y 1994).

Durante la fase 3, la inactivación de las corrientes de entrada provoca el predominio de las corrientes repolarizantes de K^+ activadas durante la fase 2 y, como consecuencia, el E_m alcanza de nuevo el valor del PR. Además, durante esta fase se produce la salida de K^+ a través de canales que presentan rectificación interna (I_{K1}), lo que determina la fase final de la repolarización (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001). En las células auriculares del sistema His-Purkinje y en los nodos SA y AV, la acetilcolina (ACh) y la adenosina se unen a sus respectivos receptores (muscarínico M_2 y de adenosina A_1 , ambos acoplados a proteínas G_i) activando otra corriente que presenta rectificación interna, la corriente de K^+ activada por ACh ($I_{K,ACh}$) (Sakmann y cols., 1983). La activación de la $I_{K,ACh}$ en las células auriculares hiperpolariza el E_m y acorta marcadamente la DPA (Shen y Kurachi, 1995; Pelleg y Belardinelli, 1993).

La fase 4 del PA se inicia una vez que el potencial de la célula alcanza de nuevo su valor de reposo y finaliza al comienzo del siguiente PA. En las células musculares auriculares y ventriculares esta fase es isoelectrica y, por lo tanto, el E_m se mantiene constante durante el periodo comprendido entre el final de un PA y el comienzo del siguiente. El mantenimiento del E_m en niveles constantes durante la fase 4 se debe principalmente a la I_{K1} (Carmeliet, 1993; Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), aunque también participan la ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ y el intercambiador Na^+/Ca^{2+} .

En la figura I.3 se muestran todas las corrientes implicadas en la génesis y en el mantenimiento del PA cardiaco en células auriculares y ventriculares. Al comparar la morfología de los PA auriculares y ventriculares se observa que la DPA es mayor en células ventriculares, lo que constituye un mecanismo protector que evita que las primeras puedan responder a frecuencias auriculares muy rápidas o a una estimulación prematura del corazón. Dentro del tejido auricular y ventricular se han identificado diferencias en la morfología y en la DPA (Figuras I.1 y 3), lo que ha sido atribuido a la diferencia de densidad y del tipo de canal iónico expresado.

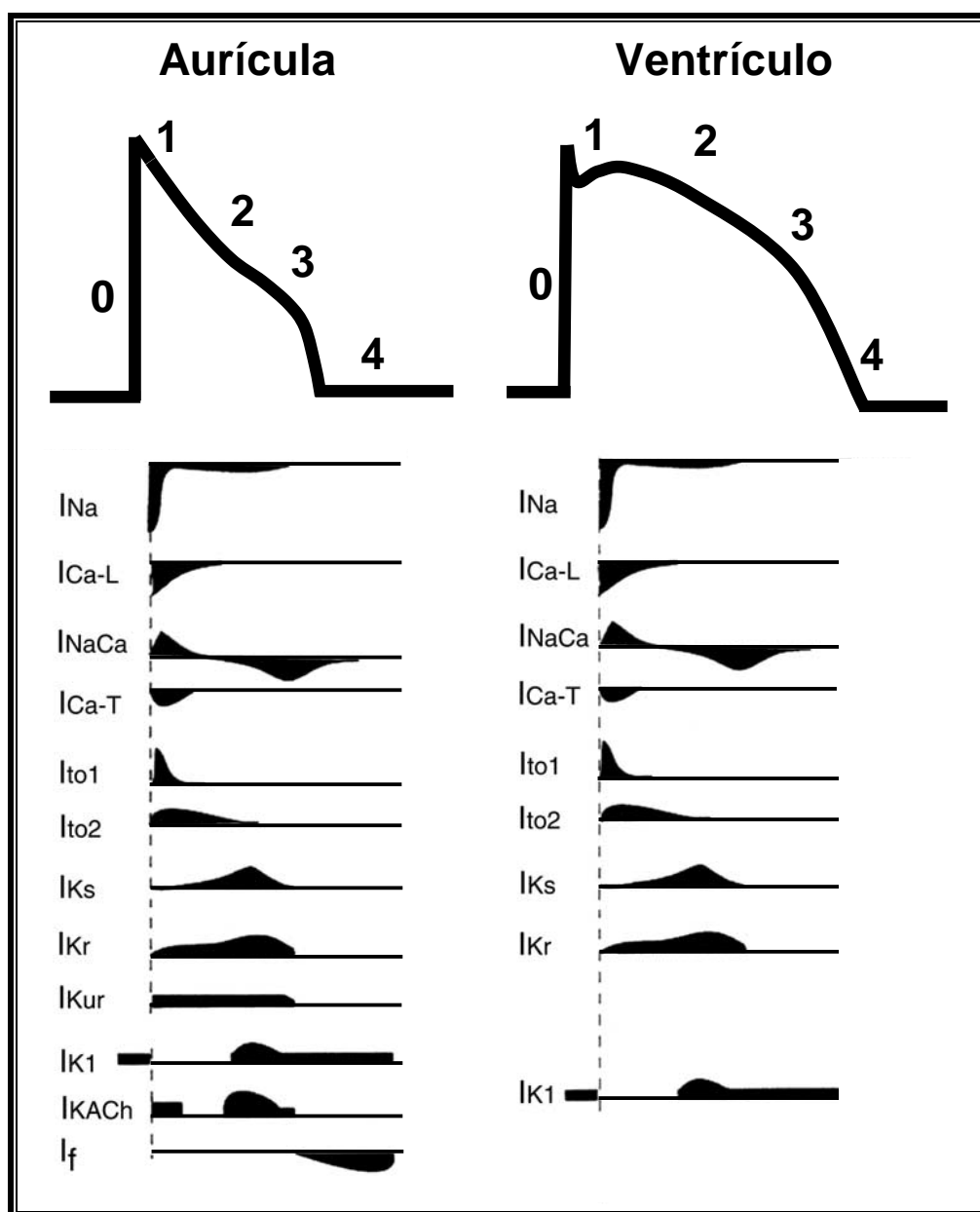


Figura I.3. Representación esquemática de PA auriculares y ventriculares con las respectivas corrientes iónicas que determinan su morfología. [Adaptada de Roberts, 2006].

1.1.2.b. PA lentos o dependientes de Ca^{2+}

Los PA dependientes de Ca^{2+} se generan en las células de los nodos SA y AV cuyo PR es de ≈ -55 mV (Figura I.4). A este potencial, la I_{Na} está totalmente inactivada, por lo que la fase 0 de los PA en estas células se debe a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L. También se generan PA dependientes de Ca^{2+} en las células de los anillos de las válvulas mitral y tricúspide y en células anormalmente despolarizadas (Reuter, 1973; Cranefield y Aronson, 1975).

La activación de la $I_{\text{Ca,L}}$ es mucho más lenta que la de la I_{Na} , por lo que la amplitud de los PA dependientes de Ca^{2+} es menor (≈ 70 -80 mV) y su propagación mucho más lenta (0,02-0,05 m/s), lo que explica su denominación de PA lentos (Isenberg y Klockner, 1982; Noble, 1984). La fase 2 (de meseta) se debe a un equilibrio entre la inactivación de la $I_{\text{Ca,L}}$ y la activación de la I_{Kr} , y la fase 3 (de rápida repolarización) se debe a la activación de las corrientes de K^+ rectificadoras tardías.

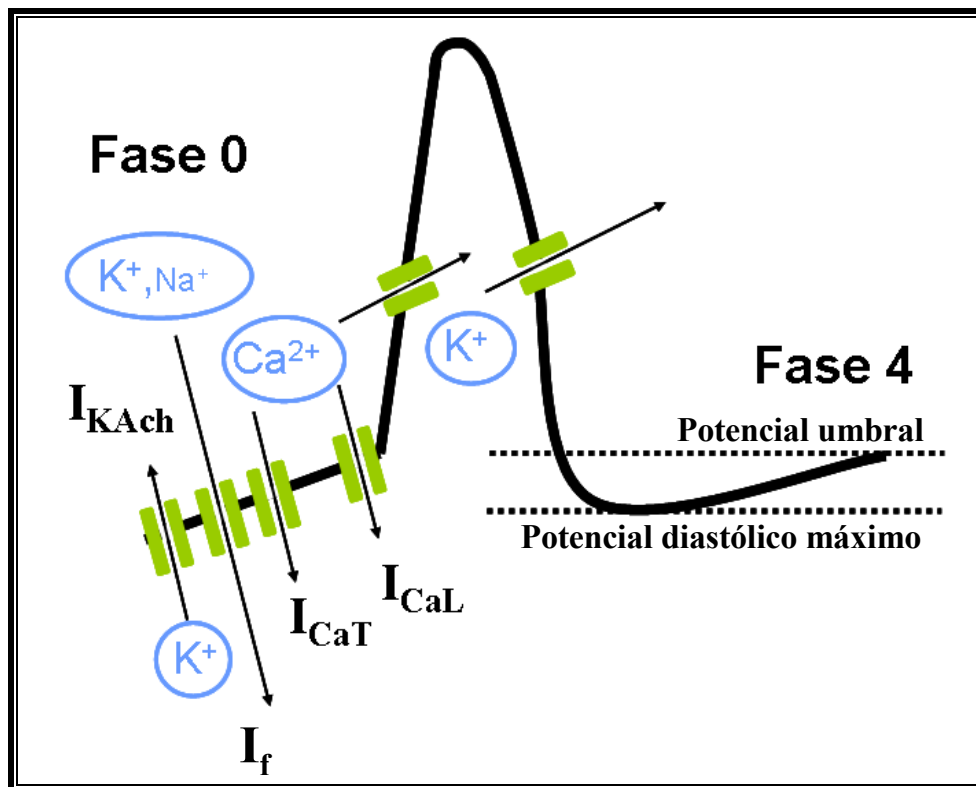


Figura I.4. PA lento o “dependiente de Ca^{2+} ”. Representación esquemática de las distintas fases del PA, donde se representan las diversas corrientes iónicas de entrada y salida implicadas en el mismo.

1.2. Automatismo

Aunque todos los miocitos cardíacos son excitables y responden a los estímulos eléctricos generando PA, algunos, además, presentan actividad automática intrínseca, es decir, son capaces de generar PA de forma espontánea. En condiciones fisiológicas, las células de los nodos SA y AV, de los tractos internodales auriculares y del sistema especializado de conducción His-Purkinje tienen actividad automática, careciendo de ella las células musculares auriculares y ventriculares (Hoffman y Cranefield, 1960). Los PA generados en estas estructuras presentan una fase 4 de lenta despolarización diastólica que desplaza el nivel del E_m hasta el nivel de potencial umbral y cuando éste se alcanza, se genera un nuevo PA propagado (Figura I.4). La frecuencia de disparo de una célula automática depende del potencial diastólico máximo, del nivel de potencial umbral y de la pendiente de la fase 4 de lenta despolarización diastólica (Figura I.4).

Una característica de las células automáticas dependientes de Na^+ es que cuando son estimuladas a una frecuencia mayor a la suya, tanto la inclinación de la fase 4 como la frecuencia de disparo disminuyen. Esta característica se denomina “supresión por sobreestimulación” (Hoffman y Cranefield, 1960). En condiciones fisiológicas, las células del nodo SA generan PA a mayor frecuencia que las restantes células automáticas (60-80 latidos/min frente a ≈ 15 latidos/min), por lo que actúan como marcapasos dominante y determinan la frecuencia cardíaca, mientras que las demás células automáticas actúan como “marcapasos latentes o subsidiarios”.

El mecanismo responsable de la fase 4 de lenta despolarización diastólica varía en los distintos tejidos cardíacos automáticos. En las células del sistema His-Purkinje esta fase se debe a la activación mantenida de la corriente hiperpolarizante marcapasos o “*funny current*” (I_f), una corriente de entrada generada a través de canales activados por la hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos (canales HCN, *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*), y a la reducción de la I_K previamente activada durante la fase 3 del PA. La I_f se activa durante la fase 3 cuando el E_m se hace más negativo de -50 mV (Baruscotti y cols., 2010; DiFrancesco, 2010). En las células de los nodos SA y AV, cuando el E_m alcanza valores de -50 mV se activa, además de la I_f , la corriente de entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo T ($I_{Ca,T}$), lo que acelera la fase final de la despolarización diastólica (Irisawa y Hagiwara, 1988). Finalmente, cuando se alcanza el potencial umbral, se activa la $I_{Ca,L}$, que es la corriente responsable de la fase 0 del PA en estas células.

1.3. Refractoriedad

Desde hace casi 150 años se sabe que el corazón requiere cierto tiempo para recuperar la excitabilidad tras un primer estímulo, tiempo que se conoce como “periodo refractario” (Bowditch, 1871).

En las células que generan PA dependientes de Na^+ , el periodo refractario viene determinado por la cinética de reactivación de la I_{Na} . Los canales de Na^+ permanecen en estado de reposo durante la diástole (fase 4), se abren durante la fase 0 del PA y, a continuación, pasan a un estado inactivo no conductor en el que permanecen hasta que la repolarización alcanza valores más negativos de -50 mV. Dado que el estado inactivo no permite la entrada de Na^+ , la aplicación de un estímulo durante las fases 1 y 2 y el comienzo de la fase 3 es incapaz de generar una respuesta propagada. Al periodo de tiempo durante el que la célula cardíaca es incapaz de generar un PA y permanece inexcitable se le denomina “periodo refractario absoluto” (Weidmann, 1955; Hoffman y Cranefield, 1960; Hondeghem y Katzung, 1977). Conforme el E_m se repolariza entre -50 y -90 mV, cierta proporción de los canales de Na^+ pasan del estado inactivo al estado de reposo y, por lo tanto, la aplicación de un estímulo eléctrico es capaz de generar una respuesta. Esta respuesta tendrá menor amplitud y se conducirá más lentamente. Por lo tanto, existe un periodo de tiempo durante el cual la célula es excitable, pero en el que aún no ha recuperado la excitabilidad completamente. Durante este periodo de tiempo, denominado “periodo refractario efectivo”, un estímulo supraumbral puede producir una respuesta local, pero no un PA propagado (Hoffman y Cranefield, 1960). Al periodo refractario efectivo le sigue otro periodo de tiempo durante el cual un estímulo es capaz de inducir la génesis de un PA propagado, denominado “periodo refractario relativo”. A este nivel, la I_{Na} todavía no se ha reactivado por completo, por lo que si en este momento se genera un PA prematuro, éste va a presentar menor amplitud y una duración más corta que un PA generado cuando la célula se ha repolarizado y ha recuperado por completo su excitabilidad. La duración del periodo refractario cardíaco determina la máxima frecuencia de estimulación cardíaca y varía con la DPA. Las células auriculares presentan una menor duración del PA y del periodo refractario que las ventriculares (≈ 200 ms en las primeras frente a los ≈ 300 ms de las segundas) lo que explica por qué la frecuencia de las arritmias supraventriculares es mayor que la de las ventriculares. El periodo refractario protege al corazón de aquellas situaciones en las que la frecuencia es muy rápida, y en las que, por tanto, se impide la relajación completa del músculo cardíaco y disminuye su función de bomba.

En los nodos SA y AV, la fase 0 del PA es debida a la activación de la $I_{Ca,L}$, corriente que presenta una constante de tiempo de reactivación de entre 100 y 300 ms (Gettes y Reuter, 1974; Bers y Pérez-Reyes, 1999). Por ello, no es posible generar un nuevo PA propagado incluso hasta después de que la célula se haya repolarizado por completo, es decir, que el periodo refractario efectivo se prolonga más allá de la DPA. A este fenómeno se le denomina “refractoriedad posrepolarización” (Trautwein y Uchizono, 1963).

1.4. Propagación del impulso cardíaco

La propagación del impulso cardíaco es un fenómeno complejo que depende no sólo del tipo, tamaño, orientación y geometría de las células cardíacas, sino también de las propiedades activas y pasivas de la membrana. Las propiedades activas están determinadas por los mecanismos iónicos dependientes de voltaje y de tiempo que controlan la excitabilidad y refractoriedad. Por otro lado, la conducción del impulso cardíaco dependerá también del acoplamiento intercelular y de las propiedades de cable de la membrana (resistencia y capacitancia), esto es, de las propiedades pasivas de la membrana.

Biofísicamente, la membrana es un elemento dieléctrico que aísla dos medios conductores. Sin embargo, este aislamiento no es perfecto, ya que existen mecanismos de transporte de iones, por lo que la resistencia al paso de cargas que ofrece la membrana ante una diferencia de potencial es finita y medible. Además, el dieléctrico (en este caso, los fosfolípidos de la membrana) que aísla los medios extra e intracelular está sometido a una diferencia de potencial en la membrana, por lo que atrae cargas a las proximidades de la membrana (los aniones del citosol serán atraídos por el exterior positivo y los cationes del medio extracelular son atraídos por el interior negativo). En estas condiciones, la membrana está acumulando carga según la ecuación:

$$Q = E_m \cdot C_m \quad (I.6)$$

donde Q es la carga acumulada y C_m la capacitancia de la membrana, que depende de las propiedades dieléctricas de la bicapa lipídica y de la geometría de la membrana. La C_m impone un retraso en la variación del voltaje y en la propagación del estímulo, ya que cualquier variación en el E_m debe vencer primero la carga acumulada en la membrana.

Los miocitos cardíacos están unidos entre sí por los discos intercalares, que permiten el acoplamiento eléctrico, y por los desmosomas, uniones especializadas que facilitan el

acoplamiento contráctil. Estas uniones permiten que el miocardio funcione como un sincitio funcional. Este acoplamiento se realiza a través de uniones de baja resistencia ($1\text{-}3\ \Omega\cdot\text{cm}^2$, unas 700 veces menor que la de la resistencia externa de la membrana), a las que se denomina “uniones estrechas” (*gap junctions*). En condiciones fisiológicas, la resistencia longitudinal o intracelular, determinada por las uniones estrechas y el citoplasma, es mínima, lo que permite un acoplamiento célula-célula que facilita la propagación sincrónica del impulso cardíaco.

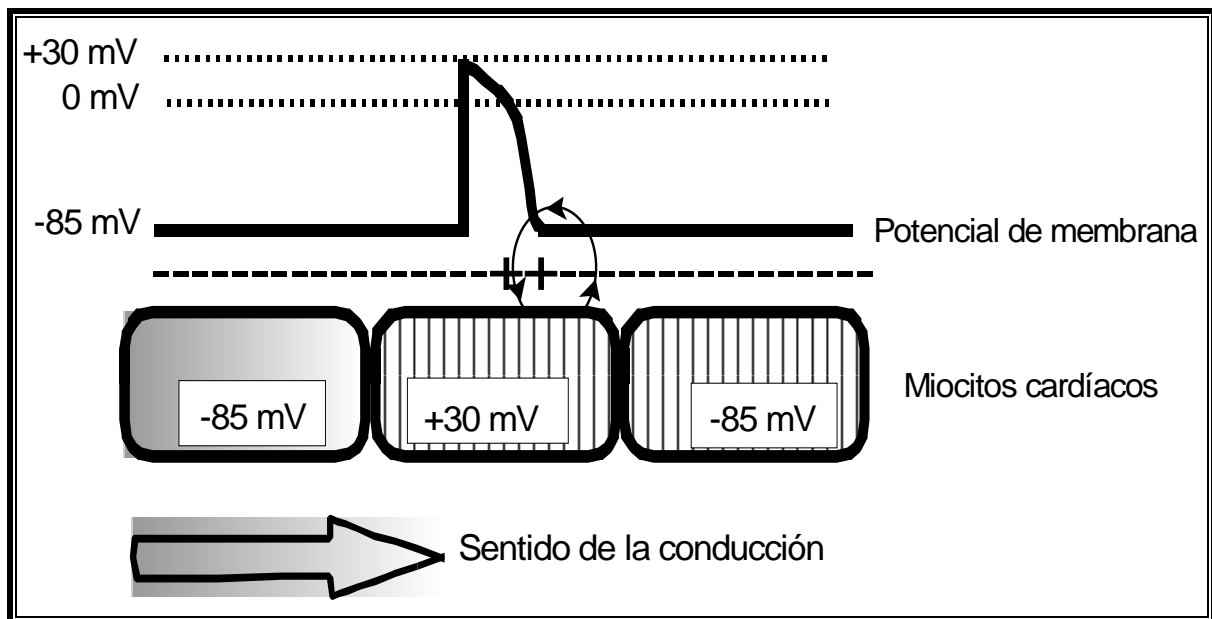


Figura I.5. Representación esquemática de la propagación del impulso cardíaco.

El impulso cardíaco se genera en el nodo SA y se propaga de forma electrotónica a las células excitables vecinas, desplazando su nivel de E_m hasta el nivel de potencial de membrana de la célula vecina ya excitada. Cuando esto sucede, se genera un nuevo PA, que a su vez despolarizará electrotónicamente las células vecinas hasta el nivel de potencial umbral produciendo la génesis de un nuevo PA y así sucesivamente (Figura I.5). La capacidad del PA propagado para desplazar el PR de una célula adyacente hasta el potencial umbral y generar un nuevo PA se denomina “factor de seguridad”. Cuanto mayor sea la amplitud de la I_{Na} que genera el PA, mayor será la velocidad de conducción con que éste se conducirá por el miocardio y, por lo tanto, mayor será el factor de seguridad de propagación del impulso cardíaco. Por el contrario, en todas aquellas situaciones en las que la I_{Na} esté parcialmente inhibida o en aquellas células que generen PA dependientes de Ca^{2+} o tras la estimulación prematura, el factor de seguridad de propagación del impulso será menor (Delpón y Tamargo, 2010). El bloqueo de la conducción en cualquiera de estas situaciones propicia la aparición de arritmias por reentrada.

Una vez que los impulsos salen del nodo SA, se propagan con rapidez a toda la aurícula, produciendo la sístole auricular. A su paso a través del nodo AV, la propagación se ralentiza, lo que permite que la contracción auricular impulse la sangre hacia los ventrículos, optimizando el gasto cardíaco y reduciendo la posibilidad de que queden remanentes sanguíneos en la aurícula. Una vez que los impulsos salen del nodo AV, entran en el sistema de conducción, donde la propagación es más rápida, permitiendo finalmente la contracción ventricular coordinada.

La actividad eléctrica cardíaca tiene su reflejo en el electrocardiograma (ECG), existiendo una relación entre los intervalos del ECG y las secuencias de activación y repolarización. La activación auricular (fase 0 de los PAs) corresponde a la onda P, y la ventricular, al complejo QRS, cuya duración es inversamente proporcional a la velocidad de conducción intraventricular. El intervalo PR refleja el tiempo de conducción a través del nodo AV, el haz de His y sus ramas, y se prolonga cuando disminuye la velocidad de conducción en dichas estructuras. La duración del intervalo QT refleja el tiempo de repolarización ventricular (Figura I.1).

2. CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE IMPLICADOS EN EL POTENCIAL DE ACCIÓN CARDÍACO

2.1. Canales de Na^+

Los canales de Na^+ dependientes de voltaje son fundamentales en la génesis y propagación de la señal eléctrica en tejidos excitables como el corazón, el músculo esquelético o el sistema nervioso (Hodgkin y Huxley, 1952a y 1952b; Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003; George, 2005).

El canal de Na^+ presenta al menos tres estados conformacionales: reposo, activo e inactivo. Durante la diástole, el canal se encuentra en estado de reposo y la probabilidad de que se abra es extremadamente baja. La despolarización de la membrana produce un cambio conformacional en la estructura del canal que causa su apertura durante 1-2 ms, generándose una corriente rápida de entrada de Na^+ . A continuación, el canal se inactiva rápidamente, lo que produce el cese de la entrada de Na^+ (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003). El paso desde el estado inactivo hasta el estado de reposo se denomina “reactivación del canal” y es un proceso necesario para que el canal pueda volver a abrirse. En situaciones fisiológicas, esta transición tiene lugar durante los primeros 50-100 ms de la diástole por lo que, considerando

que en ritmo sinusal (RS) el intervalo diastólico es de entre 500 y 700 ms, cuando llega el siguiente latido la mayoría de los canales ya están en estado de reposo y, por lo tanto, preparados para volver a abrirse (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003). Además, el canal de Na^+ es la diana farmacológica de los anestésicos locales y de los fármacos antiarrítmicos del grupo I que, a las concentraciones empleadas en terapéutica, se unen con mayor afinidad a los estados abierto e inactivo del mismo (Catterall, 2000; Yu y Catterall, 2003).

2.1.1. Estructura de los canales de Na^+

Los canales de Na^+ dependientes de voltaje están compuestos por una subunidad conductora α (de la que se han caracterizado 12 isoformas) y una o varias subunidades accesorias β (β_1 a β_4) (Figura I.6 y Tabla I.3) (Catterall, 2000; Goldin, 2002; Catterall y cols., 2005a).

Subunidad α				Subunidad β			
Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido	Gen	Proteína	Cromosoma	Tejido
SCN1A	Nav1.1* (α_1)	2q24	SNC	SCN1B	Nav β 1.1* (β_1)	19q11	SNC
SCN2A	Nav1.2 (α_2)	2q23	SNC	SCN2B	Nav β 2.1* (β_2)	11q24	SNC
SCN3A	Nav1.3* (α_3)	2q24	SNC	SCN3B	Nav β 3.1* (β_3)	11q26	SNC
SCN4A	Nav1.4* (α_4)	17q21	ME	SCN4B	Nav β 4.1 (β_4)	11q24	SNC
SCN5A	Nav1.5* (α_5)	3p21	MC				
SCN6A	Nav2.1* (α_6)	2q21-23	Útero				
SCN7A	α_7	2q36-37	SNC				
SCN8A	Nav1.6* (α_8)	2q13	SNC				
SCN9A	Nav1.7	2q24	T				
SCN10A	Nav1.8*	3p22	SNP				
SCN11A	Nav1.9	3p21	SNC				
SCN12A		3p23-21.3	SNC				

Tabla I.3. Subunidades que forman el canal de Na^+ en el hombre. *Subunidades que se expresan en el corazón. MC: Músculo cardíaco. ME: Músculo esquelético. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico. T: Tiroides. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005].

• Subunidad α

Las subunidades α de los canales de Na^+ pertenecen a una pequeña familia de proteínas con una secuencia aminoacídica altamente conservada que se expresan en diferentes tejidos y que codifican canales cuyas propiedades no son idénticas (Goldin, 2002).

El gen SCN5A codifica la subunidad α Nav1.5, responsable de la I_{Na} cardíaca. Esta subunidad está formada por 4 dominios homólogos (DI a DIV), con 6 segmentos TM dispuestos en α -hélice cada uno (S1 a S6). Los segmentos de cada dominio se conectan

mediante secuencias hidrofílicas no conservadas. El lazo que une los segmentos S5 y S6, denominado “lazo P”, es extracelular y forma parte del poro iónico. Los extremos carboxilo- y amino-terminal (C- y N-terminal, respectivamente) y los lazos de unión entre los diferentes dominios son intracelulares (Goldin, 2002; Yu y Catterall, 2003; George, 2005) (Figura I.6).

En la membrana la proteína del canal de Na^+ orienta sus cuatro dominios de forma simétrica de manera que los S5 y S6 junto con los lazos P forman las paredes del poro hidrófilo. Los S1-S4 de los cuatro dominios quedan apartados del poro rodeados por los fosfolípidos de la membrana. Clásicamente, se ha considerado que los S4 quedan, a su vez, rodeados por el resto de los segmentos TM. La mayor parte de los residuos que forman los S5 y S6 de los cuatro dominios son hidrófobos. Por su parte, los S4 presenta un residuo cargado (arginina o lisina) cada tres aminoácidos, formando una hélice de cargas positivas en la membrana. En total, 22 aminoácidos cargados positivamente (cuatro cargas positivas en el DI, cinco en los DII y DIII y ocho en el DIV) que aparecen conservados en todas las isoformas del canal de Na^+ y que actúan como “sensor de voltaje” (Stühmer y cols., 1989). La teoría más aceptada acerca del sensor de voltaje es que los S4 se mueven físicamente a través de la membrana desde el interior hacia el exterior en respuesta a la despolarización, exponiendo al exterior dos cargas positivas que se encontraban previamente ocultas en el interior de la membrana (Yang y cols., 1996; Bezanilla, 2000 y 2002).

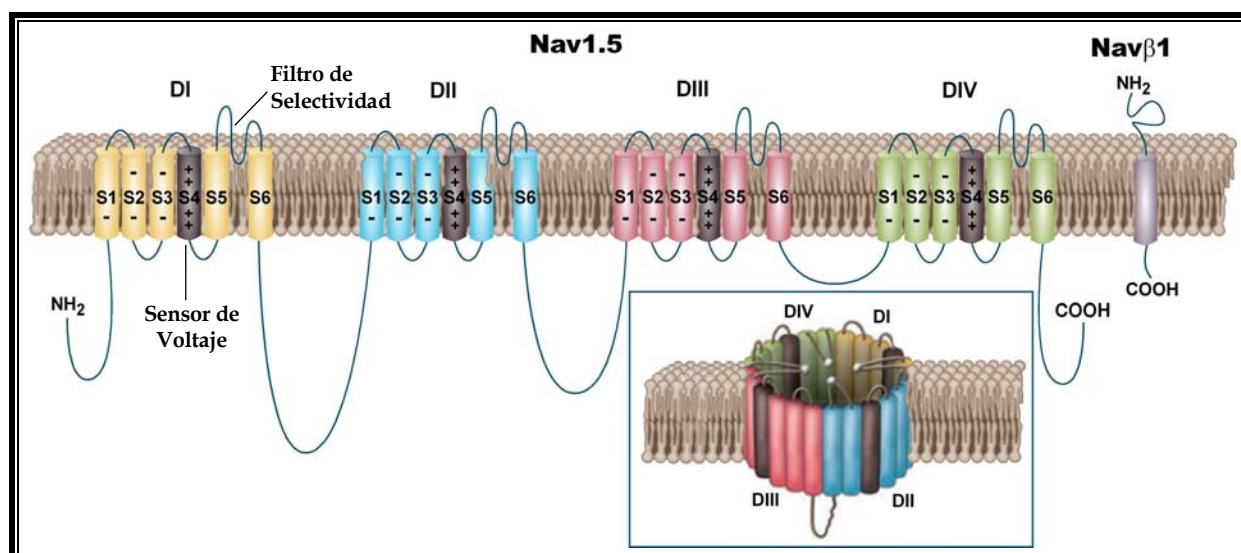


Figura I.6. Estructura del canal de Na^+ . Esquema de las subunidades α y β del canal de Na^+ . En la subunidad α , se indica el sensor de voltaje, el filtro de selectividad y los diferentes dominios (DI a DIV). [Adaptada de George, 2005].

Cuatro de los residuos presentes en los lazos P forman un anillo que se denomina “locus DEKA”: ácido aspártico en DI, ácido glutámico en DII, lisina en DIII y alanina en DIV. Esta

estructura determina la conductancia y la selectividad iónica del canal al Na^+ , así como la unión de toxinas (Noda y cols., 1989; Terlau y cols., 1991). La sustitución de estos cuatro aminoácidos por residuos de ácido glutámico (que son los aminoácidos presentes en las posiciones análogas en el canal de Ca^{2+}) convierte los canales de Na^+ en selectivos para el Ca^{2+} (Heinemann y cols., 1992).

- Subunidades auxiliares

Las principales subunidades reguladoras del canal de Na^+ son las subunidades β , de las que en la actualidad se conocen 4 isoformas (β_1 a β_4) (Tabla I.3) (Morgan y cols., 2000; Goldin, 2002). Son proteínas con un único dominio TM, un extremo N-terminal extracelular y un extremo C-terminal intracelular y presentan una secuencia tipo inmunoglobulina (Ig) (Isom y Catterall, 1996). Estas subunidades no forman parte del poro conductor del canal, pero regulan el *gating* del mismo, su expresión en la membrana y la unión con otras moléculas de la matriz extracelular y del citoesqueleto (Isom y Catterall, 1996).

Todas las isoformas identificadas se encuentran en el SNC, pero sólo algunas de ellas se han encontrado en el corazón (Tabla I.3). Su implicación en la regulación del canal de Na^+ cardíaco no está clara todavía, aunque se ha propuesto que el motivo Ig puede participar en la modulación del *gating* (Chen y Cannon, 1995; Makita y cols., 1996; McCormick y cols., 1998 y 1999). Además, la presencia de la subunidad $\text{Nav}\beta 1.1$ disminuye la afinidad de anestésicos locales y fármacos antiarrítmicos del grupo I por la subunidad $\alpha \text{Nav} 1.5$ (Balser y cols., 1996; Makielski y cols., 1996; Balser, 2001).

2.1.2. Características de la I_{Na}

La I_{Na} es la responsable de la fase 0 de los PA generados en las células musculares auriculares y ventriculares y en el sistema de His-Purkinje (Brown y cols., 1981; Fozzard y cols., 1985). La despolarización inicia un cambio conformacional que produce la apertura del canal de Na^+ (Hirschberg y cols., 1995; Yang y Horn, 1995). La I_{Na} alcanza un pico máximo en 0.5-2 ms y, a continuación, se inactiva de forma rápida (Figura I.7). El umbral de activación de la corriente se encuentra en -60 mV y alcanza su valor máximo entre -30 y -20 mV (Hodgkin y Huxley, 1952a y 1952b; Armstrong, 1981). La inactivación no sólo cierra el canal, sino que impide la reapertura del mismo hasta que haya pasado el tiempo suficiente para su recuperación, determinando así la frecuencia máxima de excitación celular y preservando el gradiente iónico intracelular, lo que impide la muerte celular.

La inactivación de la I_{Na} cardíaca sigue un proceso biexponencial, presentando un componente rápido y uno lento (Rudy, 1978; Saikawa y Carmeliet, 1982; Clarkson y cols., 1984; Patlak y Ortiz, 1985; Balser, 2001). La rapidez de la activación y la inactivación sugiere que ambos procesos podrían estar acoplados (Aldrich y cols., 1983; Catterall, 2000; Balser, 2001; Ulbricht, 2005). Incluso el canal puede pasar al estado inactivo sin haber pasado por el estado abierto (“inactivación del estado cerrado”) (Horn y cols., 1981). Se ha demostrado que la “inactivación rápida” depende de tres residuos hidrofóbicos presentes en el lazo DIII-DIV, la “secuencia IFM” (Ile1488, Phe1489 y Met1490) (Eaholtz y cols., 1994). Además, el extremo C-terminal participa en la estabilización de esta inactivación, disminuyendo la probabilidad de reapertura (Mantegazza y cols., 2001; Cormier y cols., 2002; Motoike y cols., 2004).

La “inactivación lenta” es un proceso que se prolonga durante varios cientos de ms y que es responsable del control de la entrada de Na^+ durante la fase de meseta del PA cardíaco, contribuyendo de este modo al mantenimiento de dicha fase (Clarkson y cols., 1984; Carmeliet, 1987; Fozzard y cols., 1987; Balser, 2001). La inactivación lenta disminuye al aumentar la $[Na^+]_e$ (Oxford y Yeh, 1985) y parece estar regulada por un complicado mecanismo en el que están involucrados los cuatro dominios del canal (O'Reilly y cols., 1999; Vilin y cols., 1999).

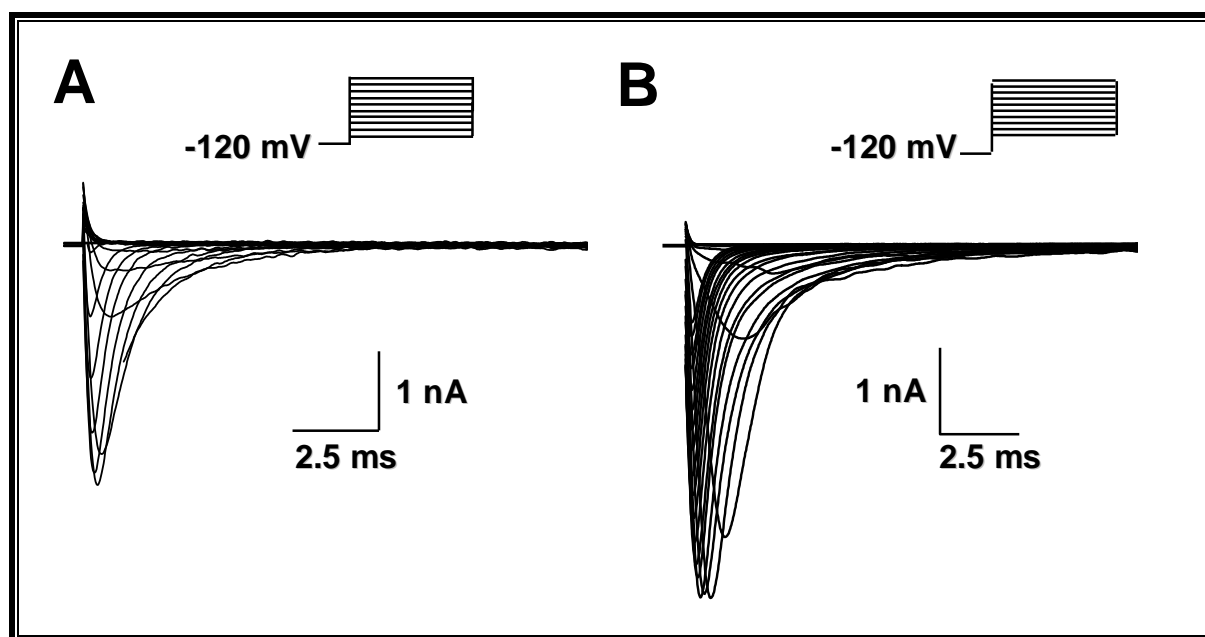


Figura 1.7. Registros de I_{Na} . (A) Trazos de I_{Na} registrados en nuestro laboratorio en miocitos auriculares humanos tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales entre -100 y +30 mV desde un potencial de fijación de -120 mV. (B) I_{Na} registrada en nuestro laboratorio en células CHO transfectadas de forma transitoria con la subunidad α Nav1.5 y la subunidad β 1 tras la aplicación de pulsos de 50 ms a potenciales desde -80 hasta +70 mV desde un potencial de fijación de -120 mV.

2.1.3. Canalopatías asociadas a los canales de Na^+ cardíacos

La importancia de los canales de Na^+ se pone de manifiesto por la existencia de diferentes enfermedades causadas por mutaciones en los genes que los codifican y que afectan a la función nerviosa o a la del músculo esquelético y/o cardíaco (Cannon y cols., 1991; Wallace y cols., 1998; George, 2005; Abriel, 2010; Amin y cols., 2010). A nivel cardíaco, las mutaciones en el gen que codifica la subunidad Nav1.5 (SCN5A) se han relacionado con la aparición de arritmias ventriculares (síndrome de QT largo tipo 3 [SQTL3], de Brugada tipo 1 [SBr1], de repolarización temprana tipo 6 [SRT6], de muerte súbita en recién nacidos y del nódulo sinusal enfermo), fibrilación auricular tipo 3 (FA3) y/o con defectos progresivos en la conducción intracardíaca (Wang y cols., 1995; Chen y cols., 1998; Schott y cols., 1999; Wei y cols., 1999; Schwartz y cols., 2000; Veldkamp y cols., 2000; Tan y cols., 2001; Grant y cols., 2002; Darbar y cols., 2008; Núñez y cols., 2013).

2.2 Canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje permiten la entrada de Ca^{2+} en respuesta a la despolarización de la membrana y son esenciales para acoplar las señales eléctricas en la superficie celular con la respuesta fisiológica a nivel celular (Nilius y cols., 1985; Bean, 1989). Inicialmente, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se clasificaron según la magnitud de la despolarización requerida para su activación: los que requerían una fuerte despolarización (HVA, *High Voltage Activated*) y los que requerían una despolarización menor (LVA, *Low Voltage Activated*). Los canales LVA son los que hoy en día se conocen como canales de Ca^{2+} tipo T, que se activan rápidamente a $E_m \approx -50$ mV y que se inactivan también rápidamente (Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Los canales HVA se abren cuando se despolariza la membrana hasta ≈ -30 mV y su inactivación puede prolongarse hasta 100 ms. Estos canales presentan diferentes propiedades cinéticas, biofísicas y farmacológicas y, hasta el momento, se han identificado 5 subtipos (L, N, P, Q y R). Sin embargo, en el miocardio humano sólo se ha demostrado la presencia de los canales de Ca^{2+} tipo L y tipo T.

Los canales tipo L se localizan principalmente en los túbulos T de la membrana, próximos y enfrentados a los receptores de rianodina del retículo sarcoplásmico (RyR2). La entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L promueve la apertura de los RyR2 con la consiguiente salida de Ca^{2+} desde los mismos. Es decir, que la I_{CaL} provoca la “liberación de Ca^{2+} inducida

por Ca^{2+} , y con ello dispara la respuesta contráctil de los miocitos cardíacos. A su vez, la I_{CaL} determina a nivel eléctrico la fase de meseta del PA. Por su parte, los canales tipo T se localizan principalmente en las células auriculares y en las células del nodo SA y en las fibras de Purkinje, mientras que su presencia en las células ventriculares es mínima (Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Yuan y cols., 1996). Debido a este patrón de expresión, se ha propuesto que los canales tipo T pueden participar en la regulación del automatismo cardíaco (Hagiwara y cols., 1988; Bean, 1989; Wu y Lipsius, 1990).

2.2.1. Estructura de los canales de Ca^{2+}

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje son heterotetrámeros compuestos por las subunidades α_1 , β y α_2/δ , y, en algunos tejidos, la subunidad γ (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005). Hasta ahora, se han identificado los genes que codifican la expresión de 10 subunidades α_1 (Catterall y cols., 2005b), 4 subunidades β , 4 complejos α_2/δ y 8 subunidades γ (Tabla I.4), aunque, a nivel cardíaco, sólo se ha demostrado la existencia de las subunidades reguladoras β y α_2/δ . Los diferentes tipos de corriente de entrada de Ca^{2+} (I_{Ca}) se definen en función de la subunidad α_1 que forma el canal, mientras que las subunidades reguladoras α_2/δ , β y γ modulan su tráfico a membrana y/o las propiedades biofísicas de la corriente (Figura I.8) (Bodi y cols., 2005; Catterall y cols., 2005b; Nerbonne y Kass, 2005).

• Subunidad α

La familia Cav1 codifica las subunidades α_1 de los canales de Ca^{2+} tipo L, siendo la Cav1.2 (α_{1C}) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005). La familia Cav2 codifica las subunidades α_1 de los canales tipo P/Q, N y R, que se encuentran mayoritariamente en el cerebro, y la familia Cav3 codifica las subunidades α_1 de los canales tipo T (Tabla I.4) (Pérez-Reyes, 2003). Los canales de Ca^{2+} presentan una gran homología estructural con los canales de Na^+ dependientes de voltaje. Las subunidades α_1 presentan 4 dominios homólogos (DI a DIV), cada uno compuesto por 6 segmentos TM en α -hélice (S1 a S6) (Figura I.8). El canal de Ca^{2+} presenta 4 cargas positivas en los S4 de cada dominio, dando lugar al sensor de voltaje. Estos residuos cargados están altamente conservados en todas las familias de canales de Ca^{2+} . Como en los canales de Na^+ , el lazo P que une los S5 y S6 de los cuatro dominios y contribuye a formar el poro del canal. Cada uno de los lazos P de los cuatro dominios contiene un residuo de glutámico (“locus EEEE”). Estos residuos forman

una zona de alta afinidad por el Ca^{2+} y conforman el filtro de selectividad del canal (Mikala y cols., 1993; Klockner y cols., 1996; Koch y cols., 2000).

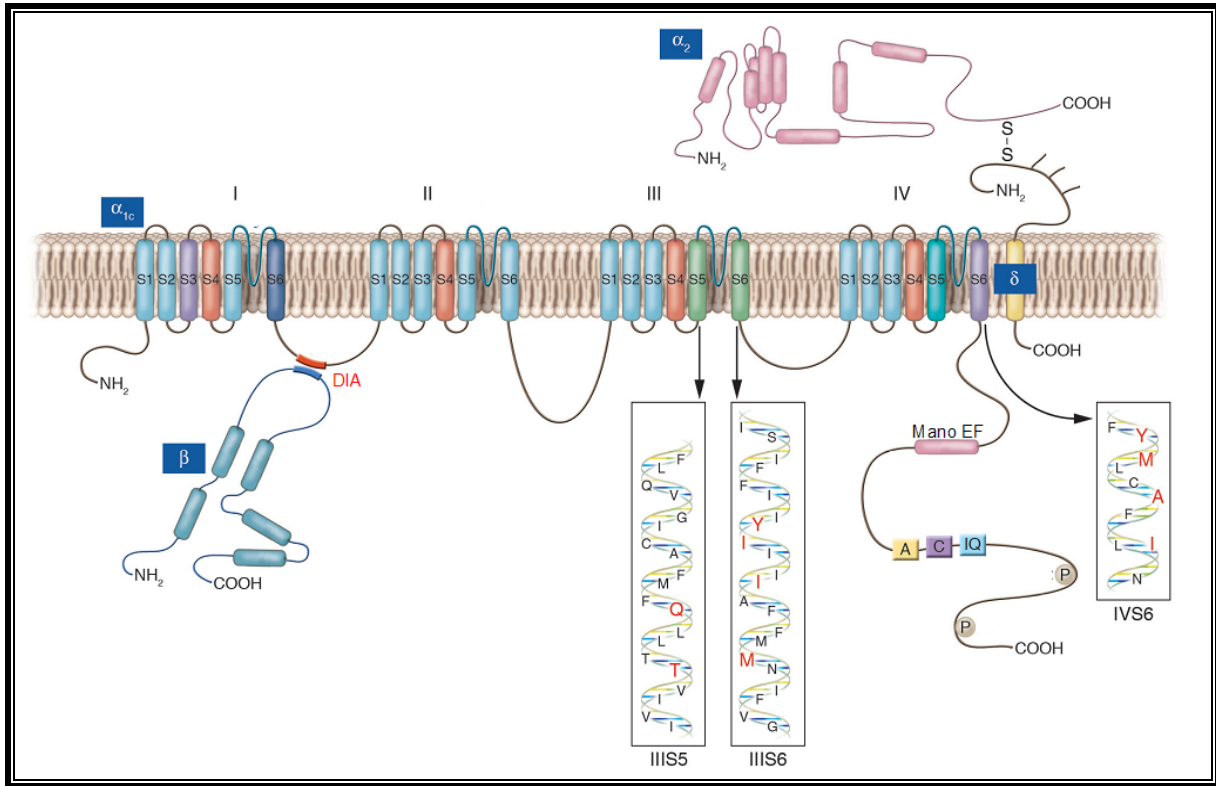


Figura I.8. Estructura del canal de Ca^{2+} tipo L. [Adaptada de Bodi y cols., 2005]

• Subunidad β

Las subunidades β son proteínas citosólicas que se ensamblan con las subunidades α_1 mediante un dominio de interacción β (DIB) que se une al dominio de interacción α (DIA) de la subunidad α_1 (Figura I.8) (De Waard y cols., 1994; Pragnell y cols. 1994; Buraei y Yang, 2010). Estas subunidades regulan la expresión en la membrana de los canales de Ca^{2+} HVA (Bichet y cols., 2000). Además, modulan las propiedades biofísicas del canal e intervienen en la regulación por el pH (Schuhmann y cols., 1997) o por receptores β -adrenérgicos (Mikala y cols., 1998). Otro posible papel de las subunidades β es intervenir en el proceso de “facilitación” de la $I_{\text{Ca,L}}$ (Cens y cols., 1996), que es un mecanismo de regulación positiva que consiste en un aumento de la amplitud máxima de la corriente inducida por la despolarización (Fenwick y cols., 1982).

• Subunidad α_2/δ

El complejo α_2/δ está formado por la unión mediante un puente disulfuro de la subunidad extracelular α_2 y la subunidad transmembrana δ (Figura I.8). La función del complejo α_2/δ

Introducción

varía según las subunidades α_1 y β con las que interacciona, aunque se ha sugerido que el dominio δ interviene en los cambios cinéticos mientras que el dominio α_2 es responsable del aumento de la expresión del canal en la membrana (Hofmann y cols., 1994; Mori y cols. 1996).

Subunidad α_1					Subunidades β reguladoras			
	Proteína	Gen	Cromosoma	I_{Ca}		Proteína	Gen	Cromosoma
Cav α 1	Cav1.1 (α_{1S})	CACNA1S	1q31-32	L	Cav β	β_1	CACNB1	17q11.2
	Cav1.2* (α_{1C})	CACNA1C	12p13.3	L		β_2^*	CACNB2	10p12
	Cav1.3 (α_{1D})	CACNA1D	3p14.3	L		β_3	CACNB3	12q12
	Cav1.4 (α_{1F})	CACNA1F	Xp11.23	L		β_4	CACNB4	2q23
Cav α 2	Cav2.1 (α_{1A})	CACNA1A	19p13	P/Q	Cav α_2 / δ	α_2/δ_1^*	CACNA2D1	7q11.2
	Cav2.2 (α_{1B})	CACNA1B	9q34	N		α_2/δ_2^*	CACNA2D2	3p14
	Cav2.3* (α_{1E})	CACNA1E	1q25-31	R		α_2/δ_3	CACNA2D3	3p13
						α_2/δ_4	CACNA2D4	12p13
Cav α 3	Cav3.1* (α_{1G})	CACNA1G	17q21	T	Cav γ	γ_1	CACNG1	17q26
	Cav3.2* (α_{1H})	CACNA1H	16p13.3	T		γ_2	CACNG2	22q13
	Cav3.3 (α_{1I})	CACNA1I	22q13	T		γ_3	CACNG3	16p12
						γ_4	CACNG4	17q26
						γ_5	CACNG5	17q26
						γ_6	CACNG6	19q13.4
						γ_7	CACNG7	19q13.4
						γ_8	CACNG8	19q13.4

Tabla I.4. Proteínas que forman los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en el humanos. * Subunidades que se expresan en el corazón. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

• Subunidad γ

La subunidad γ es una proteína con cuatro dominios TM y extremos N- y C-terminales intracelulares de la que existen al menos 8 isoformas, aunque ninguna de ellas se expresa en tejido cardíaco (Kang y Campbell, 2003).

2.2.2. Características de la $I_{Ca,L}$

La $I_{Ca,L}$ registrada en miocitos cardíacos presenta un potencial umbral de activación de alrededor de -30 mV y alcanza su máxima amplitud entre 0 y +10 mV. La activación y la

inactivación son relativamente lentas, alcanzándose el pico máximo al cabo de 1-5 ms y siendo la $\tau_{inac} > 500$ ms para los canales tipo L y mayor para los canales tipo P y R.

La inactivación de la corriente es un proceso dependiente de voltaje y de la $[Ca^{2+}]_i$ (Kass y Sanguinetti, 1984; Lee y cols., 1985; Zhang y cols., 1994). En los canales de Ca^{2+} , los procesos de inactivación y de recuperación de la inactivación están regulados por cambios estructurales en diferentes partes de la subunidad α_1 , incluyendo el poro, los lazos intracelulares y el extremo C-terminal. Además, se ha comprobado que también participan interacciones con proteínas intracelulares y subunidades auxiliares como la subunidad β . La inactivación debida a altas $[Ca^{2+}]_i$ representa un mecanismo de retroalimentación negativo de gran importancia (Brehm y Eckert, 1978) en el que están implicados un motivo de unión a calmodulina (CaM) (el “motivo IQ”), un motivo en “mano EF” y los péptidos A y C que se encuentran en el extremo C-terminal del canal (Figura I.8) (Zuhlke y cols., 1999; Peterson y cols., 2000). Así, tras la despolarización y la entrada de Ca^{2+} , la $[Ca^{2+}]_i$ aumenta hasta el rango micromolar, lo que hace que el Ca^{2+} se una a la CaM asociada al canal y se promueva la inactivación. En la inactivación dependiente de voltaje, el lazo DI-DII actúa como partícula bloqueante del canal (Kim y cols., 2004a).

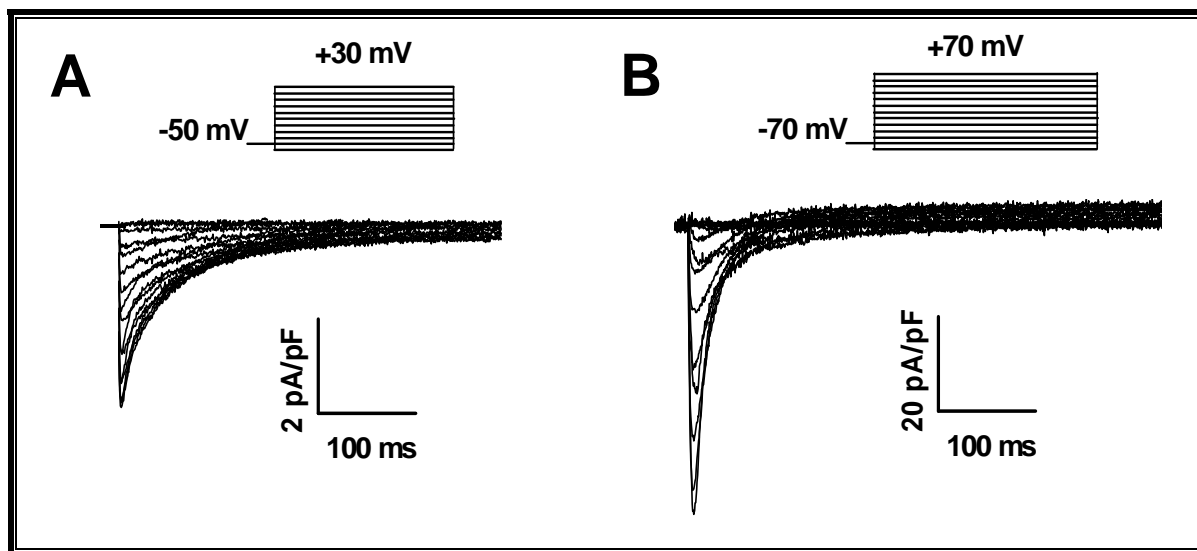


Figura I.9. Características de la $I_{Ca,L}$. (A) $I_{Ca,L}$ registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Corriente de Ca^{2+} registrada en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. La corriente fue registrada en células CHO transfectadas de forma transitoria con las subunidades $Cav\alpha 1.2$, $Cav\beta_2$ y $Cava_2/\delta$.

Otra característica de la $I_{Ca,L}$ es que al registrar su magnitud ésta no sólo depende del voltaje, sino también del catión utilizado como transportador de cargas positivas y de su concentración extracelular. De hecho, la amplitud de la $I_{Ca,L}$ aumenta al incrementar la $[Ca^{2+}]_e$ o al sustituir el Ca^{2+} por el Ba^{2+} .

2.2.3. Composición de los canales que generan la $I_{Ca,L}$

Los miembros de la familia Cav1 codifican las subunidades α_1 de los canales de Ca^{2+} tipo L, siendo la Cav1.2 (α_{1C}) la que se expresa predominantemente en el corazón (Bodi y cols., 2005). Se han identificado tres variantes de la isoforma Cav1.2 (Cav1.2a-c), de las que la Cav1.2a es la isoforma específicamente cardíaca. Además, en el corazón estos canales presentan dos tipos de subunidades auxiliares, las subunidades β y α_2/δ . El canal de Ca^{2+} tipo L es una importante diana farmacológica para el tratamiento de diversas patologías. Dada la ubicuidad del Ca^{2+} como mensajero intracelular, los fármacos que inhiben la $I_{Ca,L}$ (denominados “antagonistas del calcio”) están indicados en el tratamiento de angina de pecho, hipertensión arterial (HTA), vasculopatías periféricas, algunas taquiarritmias supraventriculares y como protectores renales y cardíacos. Los antagonistas del Ca^{2+} se dividen estructuralmente en 3 grupos: las 1,4-dihidropiridinas (DHP, como el nifedipino), las bencilalquilaminas (como el verapamilo) y las benzotiazepinas (como el diltiazem). Todos ellos tienen su sitio de unión en el poro (Hockerman y cols., 1995; Hering y cols., 1996; Schuster y cols., 1996; He y cols., 1997; Hockerman y cols., 1997).

2.2.4. Canalopatías asociadas al canal de Ca^{2+} tipo L

La canalopatía más importante que se ha identificado es la mutación G406R en el gen que codifica la subunidad Cav1.2 (CACNA1C), que se ha relacionado con la aparición de síndrome de Timothy (SQT1) (Splawski y cols., 2004; Bidaud y Lory, 2011). Esta mutación produce la rotura de la unión entre las subunidades α_1 y β lo que provoca un aumento en la amplitud de la $I_{Ca,L}$. Se manifiesta con alteraciones multiorgánicas que afectan al miocardio (prolongación del intervalo QT y arritmias graves e incluso letales), inmunodeficiencia y autismo (Splawski y cols., 2004).

Se han descrito otras mutaciones en los genes que codifican la subunidad α Cav1.2 (Antzelevitch y cols., 2007), las subunidades auxiliares Cav β 2b (Cordeiro y cols., 2009) y Cav α_2/δ_1 (Burashnikov y cols., 2010) que reducen la entrada de Ca^{2+} durante la fase de meseta del PA. Las mutaciones en el gen CACNA1C están relacionadas con los síndromes de QT corto tipo 4 (SQTC4), SBr3 y SRT2; las mutaciones en el gen CACNB2B con el SBr4 y el SRT3 y las mutaciones en el gen CACNA2D1 con el SRT4.

2.3. Canales de K⁺

Los canales de K⁺ constituyen el grupo más heterogéneo de proteínas de membrana. Se distribuyen ubicuamente a lo largo de toda la escala filogenética y están presentes prácticamente en todas las células, donde juegan un importante papel, por ejemplo, en el mantenimiento del PR celular, el control de la frecuencia de disparo de las células automáticas, la liberación de neurotransmisores, la secreción de insulina, la excitabilidad celular, el transporte de electrolitos por las células epiteliales o la regulación de la contracción del músculo liso esquelético y cardíaco (Tabla I.5).

Corriente	Subunidad α			Subunidad β		
	Proteína	Gen	Locus	Proteína	Gen	Locus
I_{tot}	Kv4.3	KCND3	11p15.1	KChIP2	KCNIP2	10q25
				DPP6	DPP6	7q36.2-36.3
				MiRP1	KCNE2	21q22.12
				MiRP2	KCNE3	11q13-q14
	Kv1.4	KCNA4	11p14.3-15.2	Kv β 1	KCNAB1	3q25
				Kv β 2	KCNAB2	1p36.3
	Kv4.1	KCND1	Xp11.23	KChIP1	KCNIP1	5q35
	Kv4.2	KCND2	7q31	KChIP2	KCNIP2	10q25
	I_{Kur} Kv1.5	KCNA5	12p13.3	Kv β 1	KCNAB1	3q25
				Kv β 2	KCNAB2	1p36.3
I_{Ks}	Kv7.1 (KvLQT1)	KCNQ1	11p15.5	minK	KCNE1	21q22.1-q22.2
I_{Kr}	Kv11.1 (hERG)	KCNH2	7q35-36	minK	KCNE1	21q22.1-q22.2
				MiRP1	KCNE2	21q22.1
K_{2p}	K _{2p} 1.1 (TWIK-1)	KCNK1	1q42-43			
	K _{2p} 2.1 (TREK-1)	KCNK2	1q41			
	K _{2p} 3.1 (TASK-1)	KCNK3	2p24.1-23.3			
	K _{2p} 5.1 (TASK-2)	KCNK5	6p21			
	K _{2p} 6.1 (TWIK-2)	KCNK6	19q13-1			
	K _{2p} 9.1 (TASK-3)	KCNK9	8q24-3			
	K _{2p} 10.1 (TREK-1)	KCNK10	14q31			
	K _{2p} 13.1 (THIK-1)	KCNK13	14q24.1-24.3			
	K _{2p} 17.1 (TASK-4)	KCNK17	6p21.1-2			
I_{K1}	Kir2.1 (IRK1)	KCNJ2	17q23.1-24.2			
	Kir2.2 (IRK2)	KCNJ12	17p11.1			
	Kir2.3 (IRK3)	KCNJ4	22q13.10			
$I_{K,ACh}$	Kir3.1 (GIRK1)	KCNJ3	2q24.1			
	Kir3.4 (GIRK4)	KCNJ5	11q24			
$I_{K,ATP}$	Kir6.2 (BIR)	KCNJ11	11p15.1	SUR2A	ABCC9	12p12.1

Tabla I.5. Subunidades α y β que generan las diferentes corrientes de K⁺ cardíacas humanas. Entre paréntesis, nombre alternativo de algunas de las proteínas. [Adaptada de Tamargo y cols., 2004b]

A nivel cardíaco, los canales de K^+ juegan un papel fundamental en el PA, ya que permiten la salida de K^+ de la célula, lo que conduce a la repolarización celular. Las cinéticas de activación e inactivación de cada canal determinan su participación en el control de la repolarización: los canales que se activan rápidamente (I_{to} e I_{Kur}) intervienen en la repolarización durante las primeras fases del PA, mientras que los canales que generan corrientes rectificadoras tardías que se activan más lentamente (I_{Kr} e I_{Ks}) participan fundamentalmente en la repolarización durante la fase 3. Los canales de K^+ presentan una distribución heterogénea en función del tejido (aurícula frente a ventrículo) e incluso dentro de un mismo tejido (endocardio frente a epicardio). La heterogeneidad en los tipos y en la distribución de los canales de K^+ determina la diferencia en la morfología de los PA de las distintas regiones del corazón (Figura I.1). Además, la expresión y las propiedades de los canales de K^+ también pueden verse modificadas por fármacos, hormonas y diferentes patologías.

El estudio electrofisiológico del mutante *Shaker* de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), denominado así por el aleteo constante que se observaba en estas moscas al ser anestesiadas con éter, permitió la clonación y secuenciación del primer canal de K^+ (Jan y cols., 1983; Papazian y cols., 1987). Desde entonces, el desarrollo de las técnicas de biología

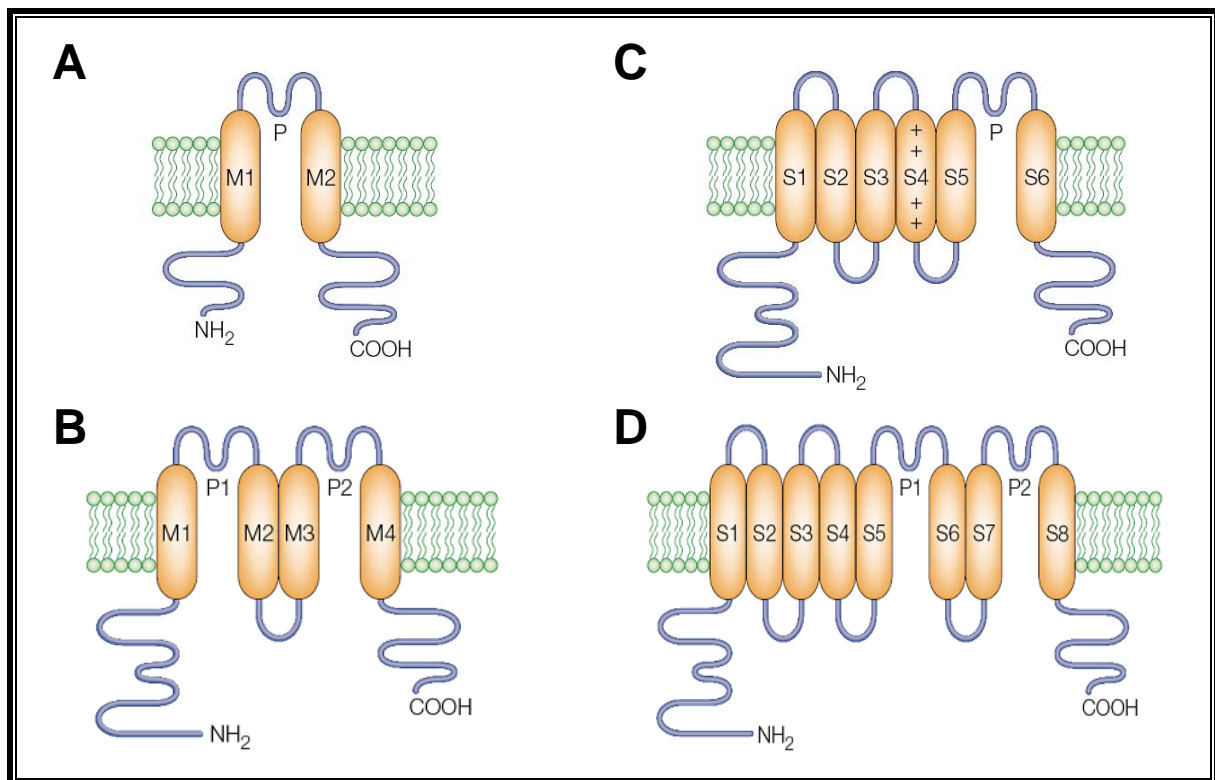


Figura I.10. Topología de la subunidad α de los cuatro grandes grupos de canales de K^+ . (A) Canales 2TM/1P. (B) Canales 4TM/2P. (C). Canales 6TM/1P. (D) Canales 8TM/2P. [Adaptadas de Choe, 2002]

molecular ha permitido identificar más de 200 genes que codifican canales de K^+ (Coetzee y cols., 1999; Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004b; Gutman y cols., 2005).

Los canales de K^+ se clasifican de acuerdo al número de segmentos TM y de poros que presentan (Figura I.10):

- Canales formados por 2 segmentos TM y 1 poro (2TM/1P). También llamados canales de K^+ rectificadores internos (canales Kir).
- Canales formados por 4 segmentos TM y 2 poros (4TM/2P), denominados canales K_{2P} .
- Canales formados por 6 segmentos TM y 1 poro (6TM/1P). Incluye a los canales de K^+ dependientes de voltaje (canales K_v) y a los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (canales K_{Ca}), que presentan un segmento TM adicional (S0) en el extremo N-terminal.
- Canales formados por 8 segmentos TM y 2 poros (8TM/2P), sólo encontrados en levaduras.

2.3.1. Canales 2TM/1P

Los canales 2TM/1P o canales Kir, desempeñan varias funciones importantes como el control de la señalización neuronal, la frecuencia cardíaca o la liberación de insulina. Desde un punto de vista evolutivo, los canales 2TM/1P son los más antiguos y su estructura recuerda

Familia	Corriente	Proteína	Gen	Cromosoma	Localización
Kir1 (ROMK)		Kir1.1-1.3	KCNJ1	17q25	Riñón, corazón, páncreas
Kir2 (IRK)	I_{K1}	Kir2.1	KCNJ2	17q23.1-24.2	Corazón, SNC, ME, ML, pulmón, placenta, riñón
		Kir2.2	KCNJ12	17p11.1	Corazón
		Kir2.3	KCNJ4	22q13.10	Corazón, SNC, ME
		Kir2.4	KCNJ14	19q13.1-13.3	Corazón, SNC, retina
Kir3 (GIRK)	$I_{K,ACh}$	Kir3.1	KCNJ3	2q24.1	Corazón, cerebelo
		Kir3.2	KCNJ6	21q22.13-22.2	Corazón, páncreas
		Kir3.3	KCNJ9	1q21-23	SNC
		Kir3.4	KCNJ5	11q24	Corazón, páncreas
Kir4 (BIR10)		Kir4.1	KCNJ10	1q22-q2	Glía
		Kir4.2	KCNJ15	21q22.2	Riñón, pulmón, SNC
Kir5		Kir5.1	KCNJ16	17q23.1-24.2	SNC, SNP
Kir6	$I_{K,ATP}$	Kir6.1	KCNJ8	12p11.23	Heterogénea
		Kir6.2	KCNJ11	11p15.1	Heterogénea
Kir7		Kir7.1	KCNJ13	2q37	SNC, riñón, tiroides

Tabla I.6. Familias de canales de K^+ 2TM/1P en mamíferos. ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. SNP: Sistema nervioso periférico.

a los S5 y S6 de los canales Kv. Sin embargo, los canales Kir carecen de una estructura semejante al aparato sensor de voltaje de los canales Kv.

Los canales Kir se han clasificado en siete familias (Kir1.x-Kir7.x) (Tabla I.6), cada una con diferentes propiedades y patrones de expresión (Kubo y cols., 2005). Hoy en día estas familias se clasifican en 4 grupos: a) canales que participan en el mantenimiento del PR (Kir2.x), b) canales acoplados a proteínas G (K_G) (Kir3.x), c) canales sensibles al ATP (Kir6.x) y d) canales transportadores de K^+ (Kir1.x, Kir4.x y Kir7.x). Las proteínas Kir presentan entre 327 y 501 aminoácidos y una homología estructural de un 30 a un 40%, mientras que dentro de cada familia el grado de homología alcanza el 60%.

2.3.1.a. La rectificación interna en los canales Kir

Los canales iónicos se pueden considerar como resistencias eléctricas situadas en la membrana plasmática que pasan cargas en forma de iones entre dos compartimentos (los medios intra y extracelular) (Dhamoon y Jalife, 2005). Las resistencias, que son independientes del tiempo y del voltaje, tienen una relación corriente-voltaje (relación I-V) lineal que se describe mediante la ley de Ohm (conductancia óhmica):

$$\text{Voltaje} = \text{Intensidad} \times \text{Resistencia} \quad (\text{I.7})$$

La conductancia (G) es la inversa de la resistencia, y frecuentemente se usa para describir las propiedades biofísicas del canal. Al contrario de lo que predice la Ley de Ohm, la rectificación interna se puede describir como una relación I-V no lineal donde aparece una reducción muy marcada y dependiente de voltaje de la amplitud de la corriente conforme se produce la despolarización de la membrana. Como resultado los canales de K^+ que presentan rectificación interna generan una corriente de entrada de gran amplitud a potenciales más negativos del E_K , mientras que a potenciales más positivos generan una corriente de salida de amplitud mucho menor (Figura I.11).

Todos los canales Kir presentan una relación I-V con rectificación interna, pero existen grandes diferencias en su grado de rectificación, su regulación y su distribución (Tabla I.6).

La rectificación interna que presentan los canales Kir se atribuye al bloqueo dependiente de voltaje del poro del canal por cationes endógenos, como el Mg^{2+} (Matsuda y cols., 1987; Vandenberg, 1987), y en particular por diversas poliaminas intracelulares como la espermina, la espermidina y la putrescina (Ficker y cols., 1994; Lopatin y cols., 1994).

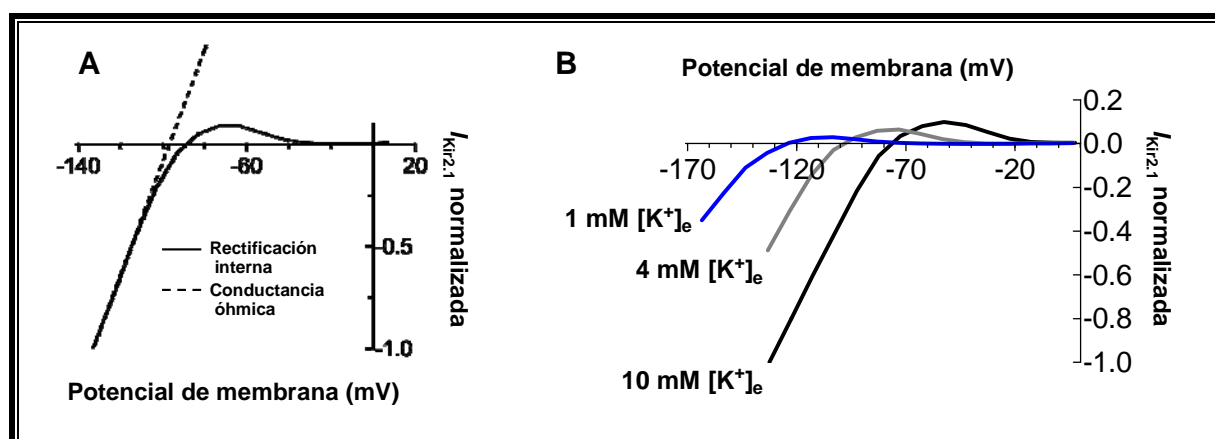


Figura I.11. Características de la rectificación interna en la I_{K1} . (A) Relación I-V de la corriente $I_{Kir2.1}$. La línea discontinua representa la corriente esperada si el comportamiento del canal siguiese la ley de Ohm.. (B) Efectos de la $[K^+]_e$ sobre la $I_{Kir2.1}$. [Adaptadas de Dhamoon y Jalife, 2005 (A) y Gómez y cols., 2009 (B)]

Otra propiedad de estas corrientes es que presentan dependencia de la concentración extracelular de K^+ ($[K^+]_e$). En concreto, un aumento de la $[K^+]_e$ produce una despolarización del E_K , un aumento de la probabilidad de apertura del canal y el desplazamiento hacia potenciales más positivos de la relación I-V (en paralelo al desplazamiento del E_K) (Figura I.11).

También se ha descrito que el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) es capaz de modular todos los canales Kir tanto en células nativas como en sistemas de expresión heterólogos (Logothetis y cols., 2007; Lopes y cols., 2007; Cheng y cols., 2011; Amorós y cols., 2013). Se ha demostrado que las interacciones entre el PIP_2 y los canales Kir2.1 producen un aumento de la probabilidad de apertura de los mismos, favoreciendo la estabilización del canal en el estado abierto y facilitando las transiciones desde el estado cerrado hacia el abierto (Xie y cols., 2008), mediante la interacción con residuos del canal situados en su mayoría en la parte superior del dominio citoplásmico (la más próxima a la cara interna de la membrana plasmática) y en la *slide helix* (Lopes y cols., 2002; Logothetis y cols., 2007). Por ello, se ha propuesto que el PIP_2 modula los canales Kir interaccionando con los extremos N- y C-terminales de los mismos, aproximando el dominio intracelular a la cara citoplásmica de la membrana y facilitando la apertura del canal (Figura I.12) (Logothetis y cols., 2007). Recientemente, nuestro grupo ha descrito que la flecainida, un antiarrítmico de clase Ic, aumenta selectivamente la I_{K1} generada por homotetrámeros de Kir2.1 uniéndose a la Cys311, residuo inmediatamente anterior a la Arg312, que modula las interacciones entre el PIP_2 y el canal (Caballero y cols., 2010a).

2.3.1.b. Estructura cristalográfica de los canales 2TM/1P

En 1998 se describió por primera vez la estructura cristalográfica mediante difracción con rayos X de un canal de K^+ , el canal bacteriano *KcsA* (Doyle y cols., 1998). Gracias a este estudio y a las cristalizaciones posteriores de otros canales 2TM/1P tanto bacterianos, *MthK* (Jiang y cols., 2002a y 2002b) y KirBac (Kuo y cols., 2003), como de mamíferos, Kir3.1 (Nishida y MacKinnon, 2002) y Kir2.2 (Tao y cols., 2009), se ha podido avanzar en el conocimiento de los aspectos fundamentales de la estructura y del funcionamiento de estos canales de K^+ .

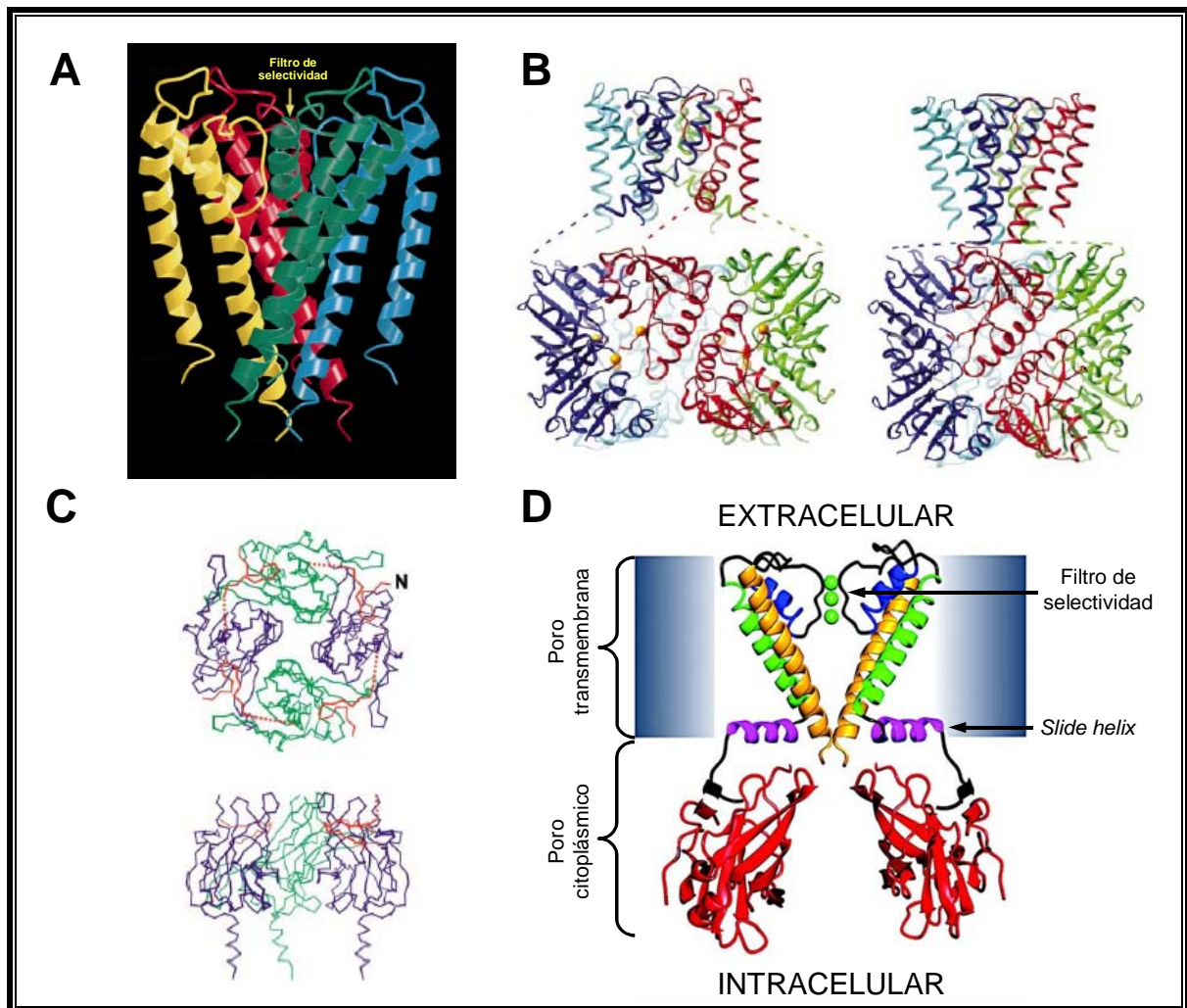


Figura I.12. Canales 2TM/1P. (A) Estructura del canal *KcsA* en una visión lateral del tetrámero. (B) Estructura cristalizada del canal *MthK* en el estado abierto (a la izquierda) y modelo hipotético de su configuración cerrada (a la derecha). (C) Estructura del dominio intracelular del canal Kir3.1 en una visión superior (desde la membrana hacia el citoplasma) (panel superior) y en una visión lateral (panel inferior). (D) Modelo de la estructura de dos de las subunidades que forman los canales Kir2 basado en la estructura cristalográfica del canal bacteriano KirBac1.1. Se pueden distinguir la *slide helix* (en rosa), los segmentos M1 y M2 (en verde y amarillo, respectivamente), el lazo P (en azul) y el dominio citoplásmico (en rojo). [Adaptadas de Doyle y cols., 1998 (A), Jiang y cols., 2002a (B), Nishida y MacKinnon, 2002 (C) y Kuo y cols., 2003 (D)]

Los canales Kir están formados por cuatro subunidades 2TM/1P que se disponen simétricamente alrededor de un poro central (Figura I.12). Cada subunidad consta de dos hélices α (M1 y M2) conectadas por una secuencia de 30 aminoácidos (lazo P) en la que se encuentra el filtro de selectividad del canal (Doyle y cols., 1998). Esta región está formada por una secuencia de aminoácidos (T-X-G-Y(F)-G) muy conservada en todos los canales de K^+ (*K⁺ channel signature*). Cabe destacar que estos canales carecen del aparato sensor del voltaje que sí poseen los canales de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ sensibles a voltaje. El dominio N-terminal y el voluminoso dominio C-terminal son citoplasmáticos. En el extremo amino terminal aparece una estructura de α -hélice (*slide helix*) que se dispone paralela a la membrana plasmática y que controla el movimiento de apertura del canal (Doyle y cols., 1998; Kuo y cols., 2005; Hibino y cols., 2010). La longitud del dominio citoplasmático de los canales Kir es, al menos, la misma que la de la porción transmembrana (Figura I.12), lo que hace que estos canales presenten un poro iónico con una longitud total (poro citoplasmático+poro transmembrana) que es aproximadamente el doble de la de otros canales de K^+ (≈ 60 Å) (Nishida y MacKinnon, 2002; Pegan y cols., 2005; Hibino y cols., 2010). Además, este dominio citoplasmático se encuentra formando un tetrámero relativamente polar y con una carga neta negativa que explicaría ciertas características de la rectificación interna de estos canales.

2.3.1.c. Principales canales 2TM/1P cuyas corrientes intervienen en el PA cardíaco

Dentro de la familia de canales Kir, las subfamilias Kir2, Kir3 y Kir6 son las que se expresan en el tejido cardíaco: los canales Kir2 participan en la formación de los canales que generan la I_{K1} (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010), las subunidades Kir3.1 y Kir3.4 (pertenecientes al grupo de canales K_G) forman el canal que genera la corriente activada por acetilcolina ($I_{K,ACh}$), responsable de los efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos observados tras la estimulación vagal (Yamada y cols., 1998; Stanfield y cols., 2002), y las subunidades Kir6 heteromerizan con el receptor de sulfonilureas (SUR) para formar los canales que generan la corriente sensible a ATP ($I_{K,ATP}$), responsable del acortamiento de la DPA que ocurre durante la isquemia (Nichols y cols., 1996; Seino y Miki, 2003).

I. La I_{K1}

La corriente rectificadora interna I_{K1} es responsable de la fase final de la repolarización y del potencial de reposo del PA auricular y ventricular (Nichols y cols., 1996; Lopatin y Nichols, 2001). Se han descrito mutaciones en los genes que codifican la expresión de las proteínas que forman los canales que generan la I_{K1} humana que conducen a la pérdida o a la ganancia de función de los mismos. La pérdida de función disminuye la I_{K1} y produce Síndrome de Andersen, que a nivel electrofisiológico se caracteriza por la prolongación del QT (SQTL tipo 7) (Plaster y cols., 2001; Tristani-Firouzi y cols., 2002). Por el contrario, la ganancia de función aumenta la I_{K1} lo que produce síndrome de QT corto tipo 3 (Priori y cols., 2005; Hattori y cols., 2012). Ambos síndromes, pero en particular el SQTC, cursan con arritmias ventriculares graves y potencialmente mortales.

I.a. Características de la I_{K1}

A potenciales más negativos que el PR, la I_{K1} presenta una conductancia mucho mayor que cualquier otra corriente, por lo que es la corriente encargada de fijar el PR cerca del E_K . Posteriormente, cuando se produce la despolarización, los canales se mantienen cerrados durante toda la fase de meseta y se abren a potenciales más negativos que -20 mV, por lo que la I_{K1} contribuye también de esta forma a la parte final de la fase 3 de la repolarización (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

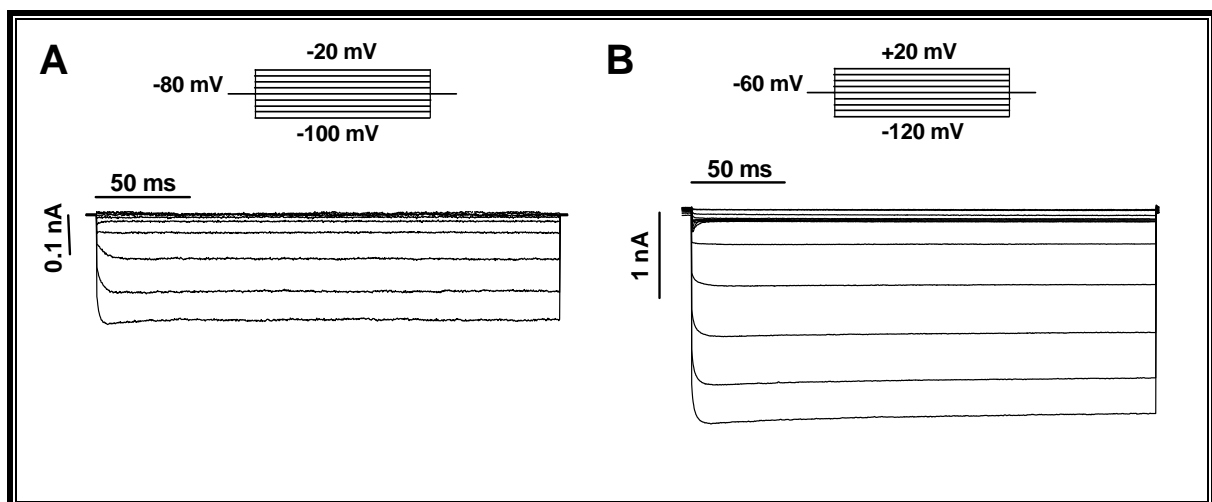


Figura I.13. Registros de I_{K1} . (A) Familia de trazos de la I_{K1} registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Corriente de K^+ rectificadora interna registrada en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. La corriente fue registrada en células CHO transfectadas de forma transitoria con la subunidad Kir2.1.

Tal y como hemos visto, las distintas morfologías del PA registradas en el corazón se deben a la diferente expresión de las corrientes iónicas, incluida la I_{K1} (Schram y cols., 2002).

La I_{K1} es prácticamente inexistente en células del nodo SA, lo que le permite mantener un PR relativamente despolarizado (-50 mV) y que éste no se mantenga estable durante la fase 4 (Schram y cols., 2002). Sin embargo, la I_{K1} está presente tanto en la aurícula como en el ventrículo aunque presenta diferencias significativas, ya que la corriente registrada en miocitos ventriculares es entre 6-10 veces mayor que la auricular, lo que permite mantener el PR más hiperpolarizado y una más rápida repolarización durante la fase 3 en el ventrículo (Lopatin y Nichols, 2001; Dhamoon y Jalife, 2005).

Al aplicar un pulso hiperpolarizante, la I_{K1} alcanza un pico máximo de corriente con una cinética de activación muy rápida (1-2 ms) para, a continuación, disminuir ligeramente hasta alcanzar un nivel estable de corriente a medida que se aplica el pulso (Figura I.13). A potenciales más negativos que el E_K se registra una corriente de entrada de K^+ de gran amplitud, mientras que a potenciales más positivos que el E_K se registra una corriente de salida de K^+ de pequeña amplitud. Además, conforme el potencial aplicado es más positivo, la amplitud de esta corriente de salida disminuye hasta cero debido al fenómeno de la rectificación interna (Figura I.13).

I.b. Composición de los canales que generan la I_{K1}

Hasta la fecha se han clonado 4 miembros de la familia Kir2 (Kir2.1 a Kir2.4) en mamíferos, aunque la expresión de los canales Kir2.4 en el corazón es mínima (solamente se ha demostrado su presencia en las células nerviosas que inervan el miocardio) y parece localizarse preferentemente en el SNC (Liu y cols., 2001), lo que señala a los otros tres miembros de la familia como los canales responsables de la I_{K1} cardíaca. Sin embargo, no se conoce con exactitud la composición de los canales que generan esta corriente. Se ha tratado de averiguar dicha composición atendiendo a las diferencias que presentan cada uno de los miembros de la subfamilia Kir2 respecto a propiedades como la conductancia, la sensibilidad al Ba^{2+} y al pH o la cinética de activación (Liu y cols., 2001, Muñoz y cols., 2007b; Panama y cols., 2007). Recientemente nuestro grupo ha descrito que la flecainida es capaz de aumentar la corriente generada por los canales Kir2.1 pero no las corrientes generadas por los canales Kir2.2 o Kir2.3 del mismo modo que no modifica la I_{K1} registrada en miocitos auriculares humanos o de cobayo. Sin embargo, la flecainida si aumentaba la I_{K1} registrada en miocitos ventriculares de cobayo (Caballero y cols., 2010b). Estos datos sugieren que la I_{K1} ventricular en cobayo está generada mayoritariamente por homotetrámeros de Kir2.1, mientras que la I_{K1} auricular está generada por heterotetrámeros de Kir2.x.

II. La $I_{K,ATP}$

En el corazón, la corriente rectificadora $I_{K,ATP}$ juega un importante papel durante la isquemia miocárdica y en el preconditionamiento isquémico (Seino y Miki, 2003; Nerbonne y Kass, 2005). El canal K_{ATP} es inhibido por el ATP intracelular y activado por el ADP-Mg, por lo que la actividad del canal es regulada por el cociente ADP/ATP (Yellen, 2002) lo que permite acoplar el E_m al metabolismo celular (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003). Por otro lado, la $I_{K,ATP}$ presenta una rectificación mucho menor que la de la I_{K1} o la $I_{K,ACh}$ (Lopatin y Nichols, 2001; Anumonwo y Lopatin, 2010).

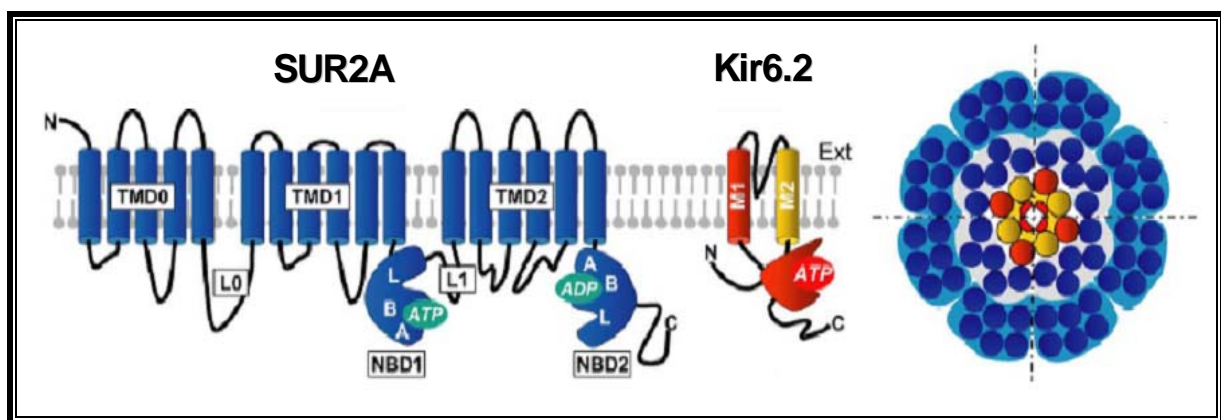


Figura I.14. Estructura de los canales K_{ATP} . Modelo estructural del canal K_{ATP} cardíaco formado por 4 subunidades Kir6.2 (en rojo y amarillo) y 4 subunidades SUR2A (en azul). Cada subunidad Kir6.2 está formada por 2 segmentos TM en α -hélice y un largo dominio citoplásmico con el sitio de unión para el ATP. Cada subunidad SUR2A contiene 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos (NBD1 y NBD2) localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 (L1) y en el extremo C-terminal. [Adaptada de Moreau y cols., 2005]

II.a. Composición de los canales que generan la $I_{K,ATP}$

El canal K_{ATP} cardíaco es el resultado de la asociación de 4 subunidades α Kir6.2 con 4 subunidades auxiliares SUR2A (Yokoshiki y cols., 1998; Seino y Miki, 2003) (Figura I.14). Las subunidades α Kir6 están formadas por 2 segmentos TM (M1 y M2) y son las que confieren al canal la capacidad de ser regulado por el ATP (Tucker y cols., 1996). Las subunidades auxiliares SUR2A tienen 3 dominios TM (TMD0, TMD1 y TMD2) y 2 dominios de unión a nucleótidos, NBD1 y NBD2 (*Nucleotide Binding Domain*), localizados en el lazo de unión entre TMD1 y TMD2 y en la región C-terminal, respectivamente (Figura I.14) (Conti y cols., 2001; Seino y Miki, 2003). Las subunidades SUR2A son las que confieren al canal la sensibilidad al ADP y a las sulfonilureas (Yokoshiki y cols., 1998; Moreau y cols., 2000; Seino y Miki, 2003). Sin embargo, hay estudios que demuestran la existencia de

canales K_{ATP} cardíacos sin la presencia de la subunidad SUR (Pu y cols., 2001), por lo que la estructura molecular exacta del canal que genera la $I_{K,ATP}$ en el miocardio sigue siendo controvertida.

III. La $I_{K,ACh}$

La densidad de los canales K_{ACh} es muy alta en las células marcapaso de los nodos SA (donde regulan la frecuencia cardíaca) y AV (donde regulan la velocidad de conducción del nodo AV) (Mark y Herlitz, 2000). Además, juega un papel importante en el control de la DPA en el tejido auricular, donde la densidad de la $I_{K,ACh}$ es 6 veces mayor que en el ventricular (Schram y cols., 2002; Tamargo y cols., 2004b).

III.a. Características de la $I_{K,ACh}$

La ACh estimula los receptores M_2 y produce la apertura de los canales K_{ACh} que generan una corriente que se caracteriza principalmente por una activación de cinética sigmoideal dependiente de tiempo y de la dosis de agonista, por lo que se tardan cientos de ms en alcanzar la amplitud máxima de la corriente (Breitwieser y Szabo, 1988). Posteriormente, y aunque la ACh esté todavía presente, se produce la disminución gradual de la corriente hasta que se alcanza un nivel cercano al estado estable, denominado “*quasi-steady-state*” (Qss) (Kurachi y cols., 1987). La apertura de los canales K_{ACh} inducida tras la estimulación del receptor muscarínico M_2 está mediada por una proteína G heteromérica formada por una subunidad G_α y un dímero $G_{\beta\gamma}$ (Yamada y cols., 1998). La estimulación del receptor muscarínico promueve la disociación del dímero $G_{\beta\gamma}$ de la subunidad G_α . El dímero $G_{\beta\gamma}$ es la molécula que interactúa con el canal promoviendo su activación (Yamada y cols., 1998). Se ha propuesto que la desensibilización a corto plazo del canal se debe a la disociación de las proteínas G del receptor tras la aplicación del agonista o a la fosforilación del receptor muscarínico M_2 y la desfosforilación del canal (Yamada y cols., 1998).

La activación de la $I_{K,ACh}$ hiperpolariza el E_m y reduce la frecuencia de disparo de las células del nodo SA, lo que explica el efecto cronotrópico negativo de la ACh. Además, reduce la frecuencia de disparo y la velocidad de conducción a través del nodo AV, lo que explica por qué la estimulación vagal puede parar las taquiarritmias por reentrada intranodal (Snyders, 1999; Tamargo y cols., 2004b).

La $I_{K_{ACh}}$ es estimulada por el ATP intracelular, el PIP_2 y por agonistas de los receptores μ -opioides, α_2 -adrenérgicos, de adenosina A1 y de endotelina ET_A e inhibida por la distensión de la membrana (dependiente de la subunidad Kir3.4) y la acidificación del medio intracelular (Ji y cols., 1998; Shieh y cols., 2000; Tamargo y cols., 2004b).

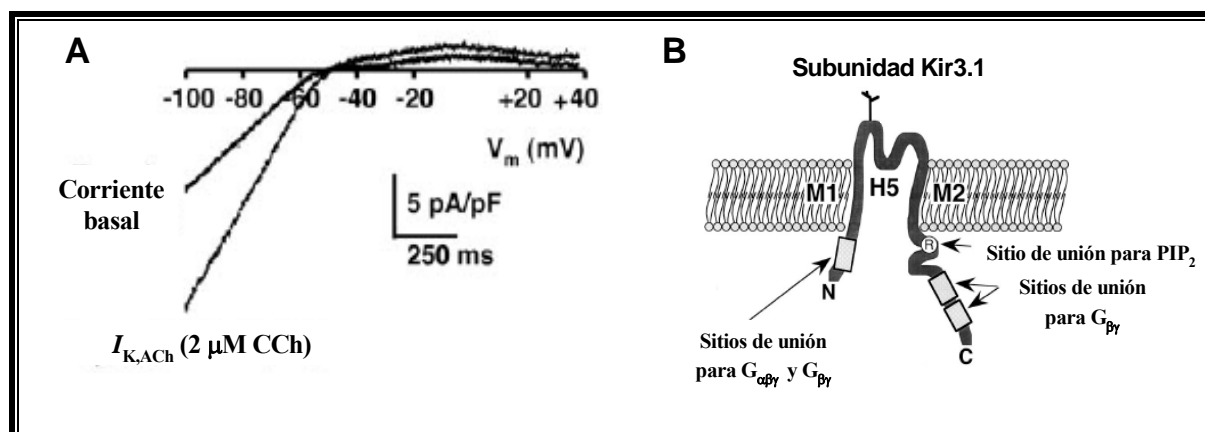


Figura I.15. Características de la $I_{K_{ACh}}$ y estructura de los canales K_{ACh} . (A) Trazos de rampas en situación control y tras la aplicación del agonista de receptores muscarínicos carbacol (CCh). (B) Esquema representativo de la estructura de la subunidad Kir3.1, formada por 2 segmentos transmembrana (M1 y M2) unidos por el lazo H5 y cuyos extremos N- y C-terminal son intracelulares. Se indican los sitios de unión de proteínas G y de PIP_2 . [Adaptadas de Dobrev y cols., 2005 (A) y Yamada y cols., 1998 (B)]

III.b. Composición de los canales que generan la $I_{K_{ACh}}$

Hasta la fecha se han clonado 4 miembros de la familia Kir3 (Kir3.1 a Kir3.4) en mamíferos y un quinto miembro (Kir3.5) en oocitos de *Xenopus laevis* (Hedin y cols., 1996). En el corazón humano, los canales que generan la $I_{K_{ACh}}$ están formados por el ensamblaje de subunidades Kir3.1 y Kir3.4, que forman una estructura tetrámerica siguiendo una estequiometría 2:2 (Dascal y cols., 1993; Krapivinsky y cols., 1995; Yamada y cols., 1998), mientras que la presencia de Kir3.2 y Kir3.3 es mínima o incluso nula (Wickman y cols., 1998). Se ha postulado que la subunidad Kir3.1 requiere de la presencia de la subunidad Kir3.4 para translocarse a la membrana celular y que se forme así el canal funcional (Kennedy y cols., 1996; Yamada y cols., 1998). Las regiones N- y C-terminales de la subunidad Kir3.1 son las responsables de la unión del dímero $G_{\beta\gamma}$ al canal, aunque se ha propuesto que el extremo N-terminal de la subunidad Kir3.4 también participa en esta unión. La unión de la subunidad G_α al canal parece estar mediada por el extremo N-terminal de Kir3.1 (Huang y cols., 1995; Tucker y cols., 1996).

2.3.2. Canales 4TM/2P

Los canales 4TM/2P (también llamados K_{2P}) se ensamblan como dímeros y generan corrientes “de fondo” (*background*) en un gran variedad de tejidos, aunque en el tejido muscular sus niveles de expresión son muy bajos o incluso nulos (Lesage y Lazdunski, 2000).

Desde que se clonó el primer canal de esta familia, el canal TASK-1 (Lesage y cols., 1996), se han clonado un gran número de estos canales que se clasifican en diferentes familias basándose en sus características farmacológicas y funcionales (Lesage y Lazdunski, 2000). A nivel cardíaco se han identificado 5 familias:

- Los canales TWIK (*Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K^+ channels*), que presentan una pequeña rectificación interna.
- Los canales TREK/TRAAK (*TWIK-RElated K^+ channels* y *TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated K^+ channels*), que son activados por ácidos grasos poliinsaturados y por la distensión de la membrana (*stretch*).
- Los canales TASK (*TWIK-related Acid-Sensitive K^+ channels*), que son sensibles a la acidosis.
- Los canales TALK (*TWIK-related ALkalosis-activated K^+ channels*), que son sensibles a la alcalosis.
- Los canales THIK (*Tandem pore domain Halothane Inhibited K^+ channels*), que son inhibidos por halotano.

Posteriormente, se adoptó una nueva nomenclatura para nombrar estos canales ($K_{2Px.y}$) y los genes que los codifican (KCNK1 a KCNK17) (Tabla I.7).

Los canales K_{2P} poseen una región central muy conservada (segmentos TM1 a TM4) y una gran diversidad en los extremos C- y N-terminal intracelulares (Figura I.10B). En estos canales se conserva la secuencia G(Y/F)G en el primer poro, aunque en el segundo poro es reemplazada por la secuencia G(F/L)G. Las corrientes generadas a través de los canales K_{2P} presentan una pequeña dependencia de voltaje y de tiempo y su relación corriente-voltaje (relación I-V) se ajusta a la ecuación Goldman-Hodgkin-Katz. El hecho de que los canales K_{2P} estén abiertos de forma casi continua sugiere su posible implicación en la regulación del E_m y de la excitabilidad celular (Lesage y Lazdunski, 2000; Patel y Honoré, 2001; O’Connell y cols., 2002).

Familia	Canal	Gen	Cromosoma	Localización
TWIK	K _{2p} 1.1 (TWIK-1)	KCNK1	1q42	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, páncreas
	K _{2p} 6.1 (TWIK-2)	KCNK6	19q11	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, páncreas, leucocitos
	K _{2p} 7.1 (TWIK-3)	KCNK7	11q12	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, placenta, páncreas
	K _{2p} 8.1 (TWIK-4)	KCNK8	11q12	
TREK/ TRAAK	K _{2p} 2.1 (TREK-1)	KCNK2	1q41	SNC, corazón, placenta, pulmón, riñón
	K _{2p} 10.1 (TREK-2)	KCNK10	14q32	SNC, páncreas, bazo, testículos
	K _{2p} 4.1 (TRAAK)	KCNK4	11q12	SNC, ME, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos, retina
TASK	K _{2p} 3.1 (TASK-1)	KCNK3	2p24	SNC, ME, corazón, placenta, pulmón, hígado, riñón, testículos, bazo, retina, intestino, piel, útero
	K _{2p} 5.1 (TASK-2)	KCNK5	6p21.1	SNC, ME, corazón, hígado, pulmón, riñón, páncreas, intestino, útero
	K _{2p} 9.1 (TASK-3)	KCNK9	8q24.3	SNC, corazón, hígado, pulmón, placenta, páncreas, testículos, leucocitos
	K _{2p} 14.1 (TASK-4)	KCNK14		
	K _{2p} 15.1 (TASK-5/KT3.3)	KCNK15	20q12	SNC, ME, placenta, testículos, páncreas
TALK	K _{2p} 16.1 (TALK-1)	KCNK16	6p21	Páncreas
	K _{2p} 17.1 (TALK-2)	KCNK17	6p21	SNC, corazón, placenta, pulmón, hígado, páncreas, testículos, ovario, leucocitos
THIK	K _{2p} 13.1 (THIK-1)	KCNK13	14q32	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos
	K _{2p} 12.1 (THIK-2)	KCNK12	2p21	SNC, ME, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículos

Tabla I.7. Familias de canales de K⁺ 4TM/2P. ME: Músculo esquelético. ML: Músculo liso. SNC: Sistema nervioso central. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005].

2.3.3. Canales 6TM/1P

Los canales 6TM/1P agrupan a los canales de K⁺ activados por voltaje (canales Kv) y a los canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (canales K_{Ca}).

Tras el clonaje del canal *Shaker* (Jan y cols., 1983; Papazian y cols., 1987) se identificaron otras tres subfamilias de genes que codifican la expresión de un gran número de canales Kv a las que se denominó *Shab*, *Shaw* y *Shal*. En mamíferos, estas cuatro familias se corresponden con las familias Kv1 (*Shaker*), Kv2 (*Shab*), Kv3 (*Shaw*) y Kv4 (*Shal*). Hasta la fecha, se han descrito doce familias de subunidades α Kv (Kv1 a Kv12), con una homología aminoacídica de ≈70% dentro de una misma familia y de ≈40% entre diferentes familias (Tabla I.8)

Introducción

(Gutman y cols., 2005). Además, la diversidad funcional de los canales Kv se ve aumentada por factores como: a) la formación de heterotetrámeros (Christie y cols., 1990; Ruppersberg y cols., 1990; Covarrubias y cols., 1991; MacKinnon, 1991); b) la presencia de miembros de las familias Kv5, Kv6, Kv8 y Kv9, que no forman canales funcionales por sí solos sino que son subunidades moduladoras que se ensamblan con subunidades Kv2 formando heterotetrámeros (Gutman y cols., 2005); c) la presencia de proteínas auxiliares, que modifican la función y/o la expresión en la membrana de los canales Kv (Gutman y cols., 2005); d) modificaciones postranscripcionales (*splicing* alternativo), que dan lugar a diferentes isoformas de los canales a partir de la expresión de un mismo gen (London y cols., 1997); y e) modificaciones postraduccionales, que regulan la función de muchos canales Kv mediante fosforilación, ubiquitinización, palmitoilación, nitrosilación, etc.

Familia	IUPHA R	Gen	Cromosoma	Localización
Kv1 (<i>Shaker</i>)	Kv1.1	KCNA1	12p13.3	Cerebro, corazón, retina, músculo esquelético, islotes pancreáticos
	Kv1.2	KCNA2	1p13	Cerebro, corazón, retina, músculo liso, islotes pancreáticos
	Kv1.3	KCNA3	1p13.3	Cerebro, pulmones, timo, hígado, nódulos linfáticos, testículos, linfocitos, fibroblastos, osteoclastos, plaquetas, islotes pancreáticos
	Kv1.4	KCNA4	11p14.3-15.2	Cerebro, músculo esquelético, corazón, islotes pancreáticos
	Kv1.5	KCNA5	12p13.3	Corazón, músculo liso, pituitaria, colon, riñón, estomago, aorta, arterias pulmonares, hipocampo
	Kv1.6	KCNA6	12p13.3	Cerebro, corazón, pulmones, testículos, músculo liso, arterias pulmonares, ovarios, astrocitos, oligodendrocitos
	Kv1.7	KCNA7	19q13.3	Corazón, músculo liso, placenta, arterias pulmonares
	Kv1.8	KCNA10	1p13.1	Riñón, cerebro, corazón, músculo esquelético, glándula adrenal
Kv2 (<i>Shab</i>)	Kv2.1	KCNB1	20q13.2	Cerebro, corazón, músculo esquelético, arterias pulmonares, pulmones, retina, cóclea
	Kv2.2	KCNB2	8q13.2	Cerebro, corazón, lengua, neuronas simpáticas, músculo liso
Kv3 (<i>Shaw</i>)	Kv3.1	KCNC1	11p15	Cerebro, pulmones, testículos, músculo esquelético
	Kv3.2	KCNC2	12q14.1	Cerebro, islotes pancreáticos, arterias mesentéricas
	Kv3.3	KCNC3	19q13.3-4	Cerebro, neuronas del SNC, arterias mesentéricas, córnea
	Kv3.4	KCNC4	1p21	Paratiroides, próstata, cerebro, células acinares pancreáticas
Kv4 (<i>Shal</i>)	Kv4.1	KCND1	Xp11.23	Cerebro, colon, corazón, pulmones, estómago, testículos, hígado, riñón, glándulas tiroideas, páncreas, arterias pulmonares
	Kv4.2	KCND2	7q31	Cerebro, corazón, cóclea
	Kv4.3	KCND3	1p13.3	Corazón, cerebro, músculo liso
Kv5	Kv5.1	KCNF1	2p25	Cerebro, corazón, músculo esquelético, hígado, riñón, páncreas

Introducción

Kv6	Kv6.1	KCNG1	20q13	Cerebro, músculo esquelético, útero, ovarios, riñón, páncreas, piel, hueso, placenta, próstata, testículos
	Kv6.2	KCNG2	18q22-23	Corazón, cerebro
	Kv6.3	KCNG3	2p21	Cerebro, testículos, intestino, glándula adrenal, timo, pituitaria
	Kv6.4	KCNG4	16q24.1	Corazón, hígado, intestino, colon
Kv7 (KvLQT)	Kv7.1	KCNQ1	11p15.5	Corazón, riñón, recto, cóclea, páncreas, pulmones, placenta
	Kv7.2	KCNQ2	20q13.3	Cerebro, pulmones, testículos, corazón, ojo, placenta, intestino
	Kv7.3	KCNQ3	8q24	Cerebro, testículos, retina, colon
	Kv7.4	KCNQ4	1p34	Cóclea, placenta
	Kv7.5	KCNQ5	6q14	Cerebro, músculo esquelético
Kv8	Kv8.1	KCNV1	8q22.3-24.1	Cerebro, riñón
	Kv8.2	KCNV2	9p24.2	Pulmones, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, colon, ovarios
Kv9	Kv9.1	KCNS1	20q12	Cerebro, melanocitos
	Kv9.2	KCNS2	8q22	Cerebro, retina
	Kv9.3	KCNS3	2p24	Cerebro, colon, corazón, estómago, riñón, pulmones, testículos, piel, útero
Kv10 (eag)	Kv10.1	KCNH1	1q32-41	Cerebro, células tumorales
	Kv10.2	KCNH5	14q23.1	Cerebro
Kv11 (erg)	Kv11.1	KCNH2	7q35-36	Corazón, cerebro, células sanguíneas y tumorales, riñón, pulmón, hígado, ovarios, páncreas, testículos, próstata, intestino, útero
	Kv11.2	KCNH6	17q23.3	Cerebro, útero
	Kv11.3	KCNH7	2q24.2	Cerebro
Kv12 (elk)	Kv12.1	KCNH8	3p24.3	Cerebro, ganglios simpáticos, pulmones, útero, testículos, colon
	Kv12.2	KCNH3	12q13	Cerebro, pulmones
	Kv12.3	KCNH4	17q21.2	Cerebro, cerebelo, esófago, pulmones, glándula pituitaria

Tabla I.8. Familias de canales de K^+ dependientes de voltaje. SNC: Sistema nervioso central. [Adaptada de Gutman y cols., 2005].

2.3.3.a. Estructura de los canales Kv

El grupo del Dr. MacKinnon ha resuelto la primera estructura cristalográfica de un canal Kv de mamífero, el canal formado por la subunidad α Kv1.2 y la subunidad auxiliar Kv β 2 de cerebro de rata (Long y cols., 2005a y 2005b), que venía a confirmar los modelos que se habían propuesto anteriormente para los canales Kv tras la resolución de otros canales de K^+ no dependientes de voltaje (Doyle y cols., 1998; Zhou y cols., 2001) y de canales Kv

bacterianos (Sokolova y cols., 2001; Jiang y cols., 2003a y 2003b). La estructura resuelta se correspondía con la de un canal tetramérico en estado abierto cuyas dimensiones eran de 135x95x95 Å, con un poro de ≈ 12 Å de diámetro (Figura I.16).

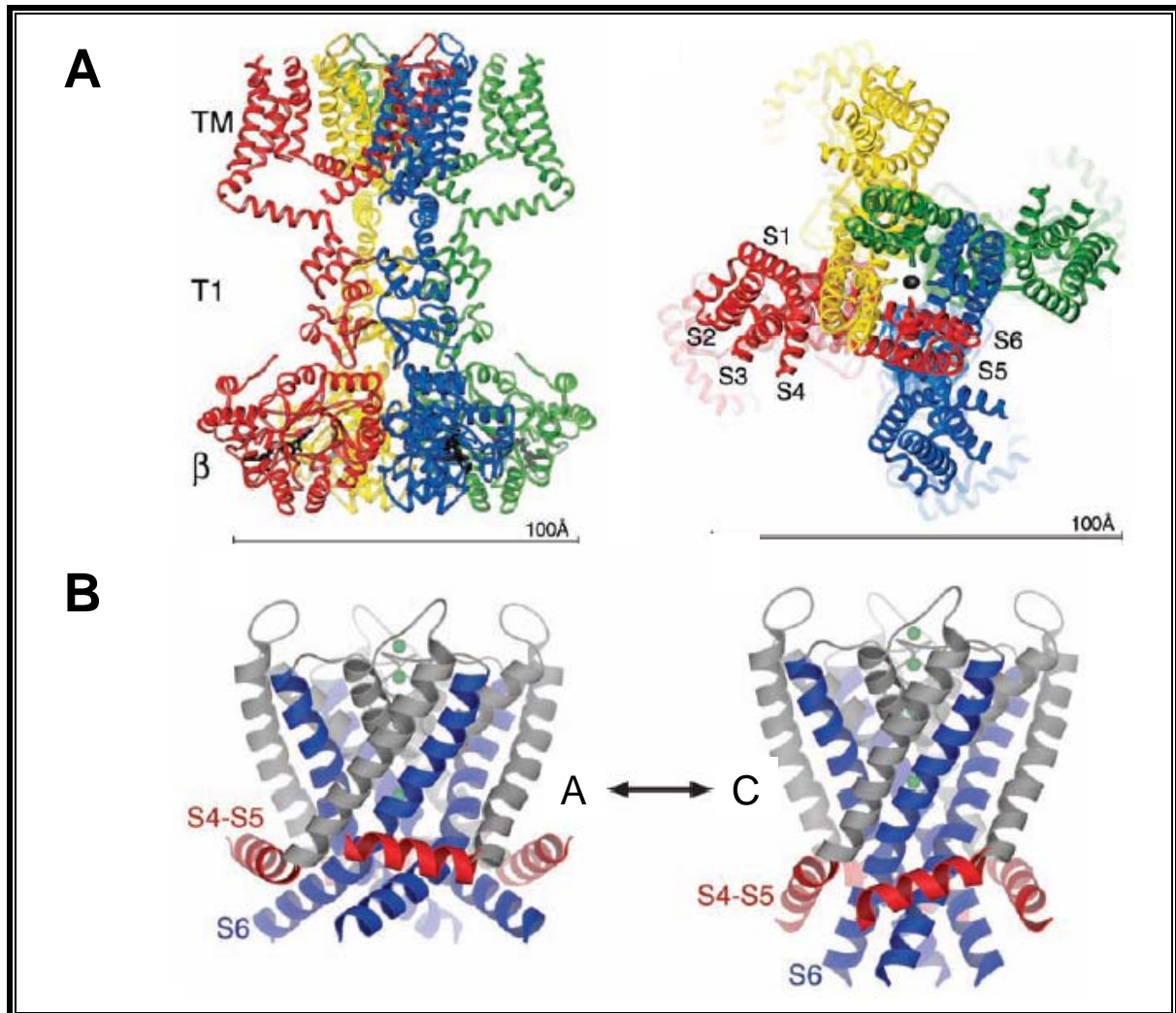


Figura I.16. Estructura del complejo formado por la subunidad α Kv1.2 y la subunidad auxiliar β_2 . (A) Vistas lateral (a la izquierda) y desde el lado extracelular (a la derecha) del complejo Kv1.2/Kv β_2 . (B) Modelo propuesto del canal Kv1.2, donde se observa la diferente posición del lazo S4-S5 en los estados abierto (a la izquierda) y cerrado (a la derecha). [Adaptadas de Long y cols., 2005a (A) y 2005b (B)]

Existen dos patrones fundamentales de organización estructural en la familia de canales Kv: los canales Kv1 a Kv4 presentan una estructura denominada T1 o “dominio NAB” (*N-terminal A and B box*) en el extremo N-terminal que se ha demostrado fundamental para el reconocimiento entre subunidades α y responsable de la interacción con subunidades β y otras proteínas (Figura I.17B), mientras que los canales Kv7, Kv10 y Kv11 no presentan ese dominio T1 (Figura I.17C) (Shen y Pfaffinger, 1995; Xu y cols., 1995; Kreusch y cols., 1998; Yellen, 2002).

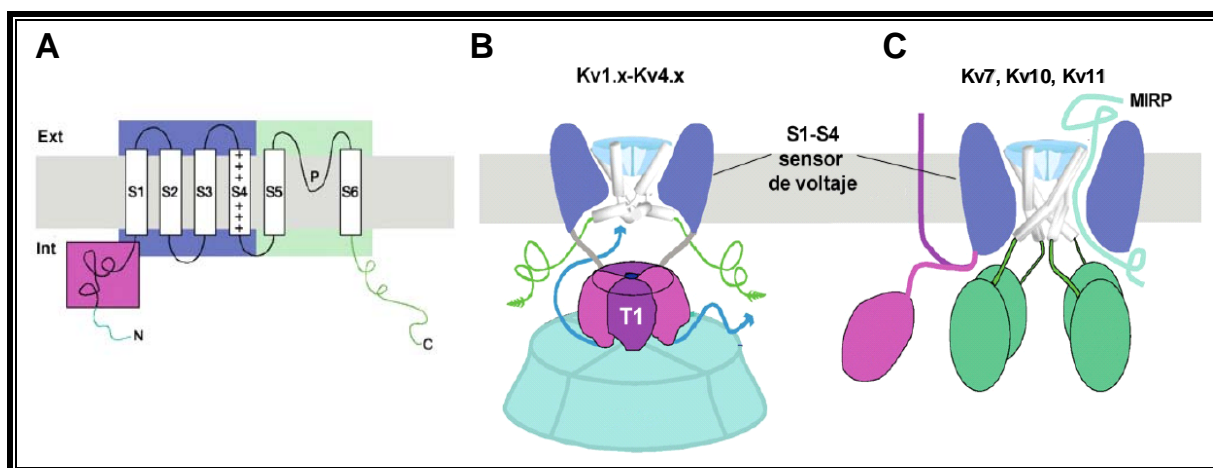


Figura I.17. Estructura de la subunidad α de los canales Kv. (A) Esquema de la estructura de la subunidad α de los canales Kv, donde se observan los 6 segmentos TM y los segmentos N- y C-terminales intracelulares. El recuadro rosa indica la posición del dominio T1. (B-C) Disposición estructural de los dominios intracelulares de los canales Kv1 a Kv4 (B) y de los canales Kv7, Kv10 y Kv11 (C). [Adaptadas de Yellen, 2002]

I. La subunidad α

En los canales Kv, cada subunidad α consta de 6 segmentos TM (S1 a S6) con estructura de hélice α y conectados entre sí por secuencias hidrofílicas no conservadas (Figuras I.10C y I.17A). Los S1 a S4 constituyen el sensor de voltaje y la secuencia que conecta el S5 y el S6 se denomina región P y forma parte del poro iónico (Liman y cols., 1991; MacKinnon, 1991; Yellen y cols., 1991; Yool y Schwarz, 1991).

• Poro iónico y filtro de selectividad

Las cuatro subunidades α que forman el canal se disponen de tal forma que la boca externa del poro está formada por el lazo P, mientras el segmento S6 y la región peptídica que une los segmentos S4 y S5 forman la boca interna del poro.

La región que une los segmentos S5 y S6 es el sitio de unión de muchas toxinas y el segmento de unión de S4-S5 forma parte del receptor para la partícula de inactivación (Isacoff y cols., 1991). Gracias a estudios de mutagénesis dirigida en canales, se ha podido demostrar que en el poro iónico se encuentran los lugares de unión para el tetraetilamonio (TEA) (Yellen y cols., 1991; Choi y cols., 1993), fármacos antiarrítmicos como la quinidina (Yeola y cols., 1996), o anestésicos locales como la bupivacaína (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997) y la benzocaína (Caballero y cols., 2002).

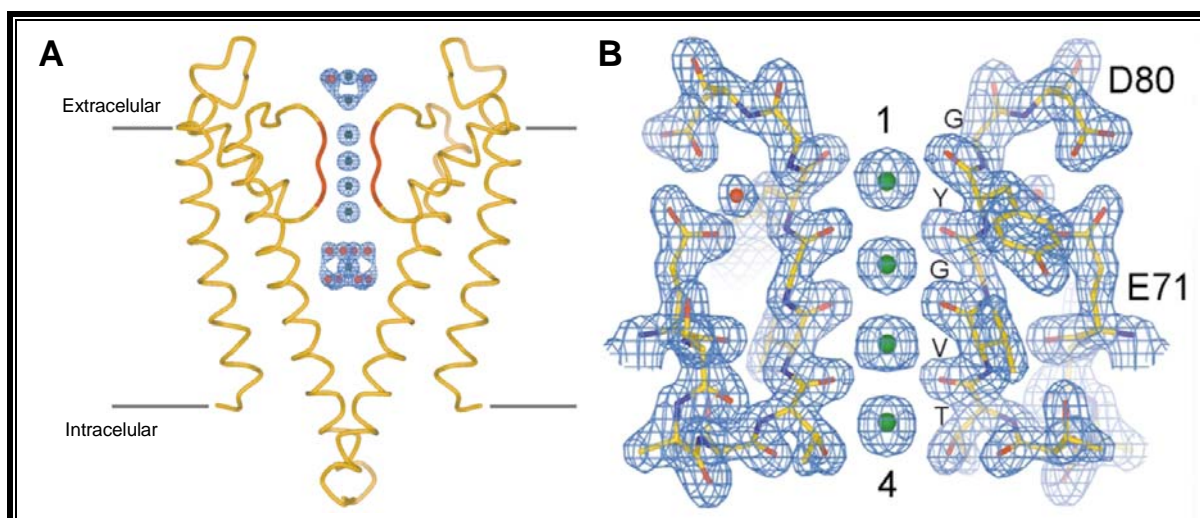


Figura I.18. Representación esquemática del filtro de selectividad de los canales de K^+ . (A) Representación esquemática de dos de las subunidades que forman el canal *KcsA* en una vista lateral, con la región que forma el filtro de selectividad señalada en rojo. Los sitios de unión de los iones K^+ se representan como esferas verdes y las moléculas de agua como esferas rojas. (B) Detalle de la secuencia del filtro de selectividad del canal *KcsA*, donde se representan como esferas verdes los cuatro posibles sitios de unión para los iones K^+ . [Adaptadas de Zhou y MacKinnon, 2003]

El radio de un átomo de K^+ es de 1.33 Å, mientras que el de un átomo de Na^+ es de 0.95 Å. Pese a esta pequeña diferencia en el radio atómico, los canales de K^+ son capaces de discriminar entre ambos iones con una selectividad superior a 1000 veces para el K^+ , con una velocidad de conducción $\approx 10^8$ iones/s. El filtro de selectividad del canal se encuentra en una región del lazo P formada por los aminoácidos (T/S)xxTxGYG, denominada “secuencia de selectividad del K^+ ” y que está altamente conservada en todos los canales de K^+ (MacKinnon y Yellen, 1990; Heginbotham y cols., 1994). A excepción de los aminoácidos que forman el filtro de selectividad, los aminoácidos que constituyen las paredes del canal son hidrófobos, minimizándose así la interacción electrostática del K^+ con el canal y creándose una ruta de baja resistencia desde el citoplasma hasta el filtro de selectividad que permite que el ion K^+ hidratado pase fácilmente desde la solución intracelular hasta la cavidad central, donde alcanza una elevada concentración (≈ 2 M) (Zhou y cols., 2001).

Una vez allí, el ion K^+ ha de atravesar el estrecho paso que forma el filtro de selectividad y para ello ha de perder sus capas de hidratación. La entrada de un ion K^+ en el filtro de selectividad crea un dipolo, de manera que un ion K^+ dispone de cuatro sitios de unión a lo largo del filtro de selectividad, formados por los átomos de oxígeno de los carbonilos de los residuos TxGYG. Para compensar el coste energético que supone la deshidratación del ion al atravesar el filtro, los átomos de oxígeno hacen las veces de moléculas de agua de manera que durante su paso a través del filtro de selectividad los iones K^+ se encuentran rodeados de ocho átomos de oxígeno, en una disposición similar a la que adoptan las moléculas de agua que

rodean a los iones de K^+ en el medio acuoso (Figura I.18) (Roux y MacKinnon, 1999; MacKinnon, 2003).

El filtro de selectividad presenta una longitud de 12 Å, de manera que a lo largo del filtro normalmente se encuentran 2 iones K^+ (≈ 2.7 Å), separados por una molécula de agua, a una distancia de 3.5 Å (Morais-Cabral y cols., 2001; Zhou y MacKinnon, 2003). La presencia de un único ion K^+ permitiría una fuerte interacción de éste con los aminoácidos del filtro, pero la entrada de un segundo ion produce una repulsión electrostática mutua, que compensa la atracción del filtro de selectividad y produce la salida del ion K^+ hacia el espacio extracelular (Doyle y cols., 1998).

• *Sensor de voltaje*

La principal característica de los canales Kv consiste en que son capaces de detectar los cambios de voltaje producidos en la membrana y acoplar esta señal a su funcionamiento (Armstrong, 1974; Sigworth, 1994; Bezanilla, 2000 y 2002). La dependencia de voltaje de los canales de K^+ se debe a la presencia en su estructura de un sensor de voltaje que está formado por los cuatro primeros segmentos del canal (S1-S4). El segmento S4 contiene cuatro o más residuos arginina y lisina, cada uno de los cuales separado por dos residuos hidrofóbicos, que se recolocan en la membrana cuando el E_m varía. Así, la apertura y cierre del canal generan un movimiento del sensor de voltaje de ≈ 12 -13 e_0 a través del campo eléctrico transmembrana (Schoppa y cols., 1992; Hirschberg y cols., 1995), resultando en una corriente denominada “corriente de *gating*”, que puede ser medida experimentalmente (Armstrong y Bezanilla, 1973). Mutaciones en las que se neutralizan los aminoácidos cargados del S4 desplazan el valor del punto medio de la curva de activación del canal, lo que indica que el S4 juega un importante papel en el cambio conformacional que conlleva su apertura (Liman y cols., 1991; Papazian y cols., 1991).

El hecho de que sólo se muevan 12-13 e_0 y no 16 (4 aminoácidos cargados por S4), indica que el movimiento de las cargas no es perpendicular al campo eléctrico. Se han sugerido dos posibles modelos de movimiento del sensor: un modelo de “rotación”, con la exposición de determinados residuos del S4 en ranuras acuosas en las que el campo eléctrico está muy confinado, y un modelo “de inclinación” o “modelo de remo”, que implica grandes desplazamientos del sensor (Figura I.19A y B) (Jiang y cols., 2003b; Tombola y cols., 2005).

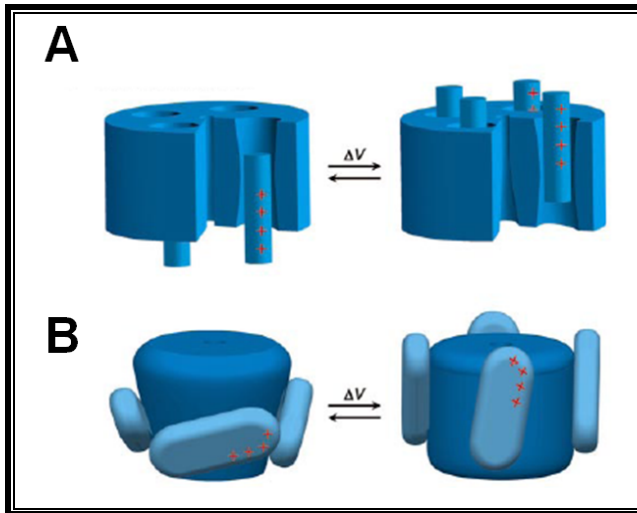


Figura I.19. Modelos de movimiento del sensor de voltaje. (A) Modelo convencional en el que el movimiento de cargas se realiza a través del núcleo proteico del canal mediante un movimiento de traslación y/o rotación del S4. (B) Modelo en el que el sensor de voltaje se encuentra sumergido en los lípidos de la membrana, produciendo el desplazamiento de cargas a través del campo eléctrico. [Adaptadas de Jiang y cols., 2003b]

II. Subunidades auxiliares

El ensamblaje de 4 subunidades α es suficiente para formar un canal funcional que genere una corriente iónica. Sin embargo, la presencia de subunidades auxiliares aumenta la diversidad funcional de los canales Kv (Figura I.20 y Tabla I.9) y regula funciones como el *gating* y la expresión y/o el transporte a la membrana celular de los canales. Además, estas subunidades pueden servir como sitio de unión de moléculas adaptadoras o de ligandos exógenos/endógenos.

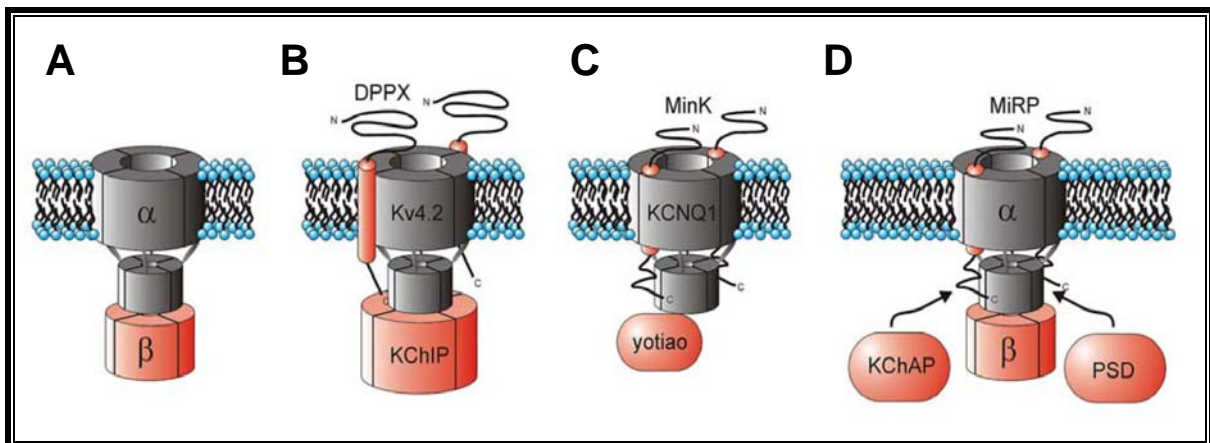


Figura I.20. Dibujo esquemático de diversas subunidades auxiliares de canales iónicos. Las subunidades α aparecen en gris y las subunidades β en rojo. (A) Ensamblaje de 4 subunidades α Kv a través del extremo N-terminal con 4 subunidades Kv β citosólicas. (B) Interacción del canal Kv4.2 con un complejo de 4 subunidades citoplásmicas KChIP. Se observa también la asociación de la subunidad DPPX con la subunidad α . (C) Asociación de 4 subunidades Kv7.1 con 2 subunidades minK, así como la formación del complejo macromolecular con la proteína adaptadora yotiao. (D) Complejo molecular formado por una subunidad α Kv, las subunidades auxiliares Kv β , MiRP y KChAP y una proteína de densidad pos-sináptica (PSD). [Adaptadas de McCrossan y Abbott, 2004]

Familia	Subunidad	Gen	Cromosoma
Kvβ	Kv β 1*	KCNAB1	3q25
	Kv β 2*	KCNAB2	1p36.3
	Kv β 3	KCNAB3	17p13
minK y péptidos relacionados (KCNE)	minK*	KCNE1	21q22
	MiRP1*	KCNE2	21q22
	MiRP2*	KCNE3	11q13
	MiRP3	KCNE4	2q36.3
	MiRP4*	KCNE5	Xq22
KChAP	KChAP*	PIAS3	1q12
KChIP	KChIP1	KCNIP1	5q35
	KChIP2*	KCNIP2	10q25
	KChIP3	KCNIP3	2q11.2-11.3
	KChIP4.2	CSEN	2q11.1
	KChIP4.3	KCNIP4	4p15.3
DPP	DPP6*	DPP6	7q36.2-36.3
	DPP10*	DPP10	2q14.1

Tabla I.9. Principales subunidades auxiliares de los canales Kv. *Subunidades que se expresan en el miocardio. [Adaptada de Nerbonne y Kass, 2005]

• Subunidades Kv β

La familia de las subunidades Kv β está compuesta por tres proteínas homólogas (Kv β 1 a Kv β 3), así como por varias isoformas de alguna de ellas (Wang y cols., 1996; Martens y cols., 1999). Estas proteínas poseen una simetría 4x muy similar a la de las enzimas óxido reductasa, por lo que se ha sugerido que podrían actuar como sensores redox del canal (Bähring y cols., 2001). Las subunidades Kv β son proteínas citosólicas que se ensamblan a la subunidad α por el extremo N-terminal y su principal efecto es inducir una rápida inactivación de la corriente (especialmente las Kv β 1), aunque también se ha descrito una función tipo chaperona que podría promover o estabilizar la expresión de los canales en la membrana (Figuras I.20A y D) (Nakahira y cols., 1996; Martens y cols., 1999; Wissmann y cols., 1999). Aunque las proteínas Kv β se identificaron inicialmente como subunidades reguladoras de los canales Kv1, actualmente se piensa que participan también en la regulación de canales de las subunidades α Kv2 y Kv4 (Yang y cols., 2001; Aimond y cols., 2005).

• Subunidad minK y péptidos relacionados

Hasta la fecha se han descrito 5 proteínas codificadas por genes de la familia KCNE (KCNE1 a KCNE5). Todas ellas presentan un único segmento TM, un dominio N-terminal

extracelular y un dominio C-terminal intracelular (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

La proteína minK (*minimal K⁺ channel subunit*) fue la primera en ser identificada (Takumi y cols., 1988; Murai y cols., 1989) y su asociación con la subunidad α Kv7.1 genera la I_{Ks} (Figura I.20C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). También se ha descrito que puede interaccionar con las subunidades α Kv11.1 y Kv4.3. Además, mutaciones en el gen que codifica la subunidad minK producen una disminución de la I_{Ks} que se relaciona con la aparición de SQT5 (Splawski y cols., 2000). Las siguientes subunidades auxiliares codificadas por genes KCNE se identificaron por homología con minK y se denominaron MiRP (*MinK-Related Peptides*) (Figura I.20D) (Abbott y cols., 1999; McCrossan y Abbott, 2004). Se ha demostrado la presencia de MiRP1, MiRP2 y MiRP3 en tejido miocárdico humano, donde se ha sugerido que podrían ensamblarse con las subunidades α Kv11.1, Kv7.1, Kv4.2 y Kv4.3 (Abbott y cols., 1999; Finley y cols., 2002; McCrossan y Abbott, 2004; Radicke y cols., 2006; Delpón y cols., 2008). Además, mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP1 se han relacionado con la aparición de SQT6 (Abbott y cols., 1999) y de FA (Zhang y cols., 2005), mientras que mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP2 se han relacionado con la aparición de FA (Zhang y cols., 2005) y SBr (Delpón y cols., 2008).

• Subunidad KChAP

La subunidad KChAP (*K⁺ Channel-Associated Protein*) pertenece a la familia de proteínas inhibidoras del STAT activado (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Wible y cols., 1998). Estas proteínas interactúan con una gran variedad de factores de transcripción e intervienen en procesos como la apoptosis (Wible y cols., 2002). La subunidad KChAP es una proteína citoplásmica que puede unirse al extremo N-terminal de las subunidades α Kv1, Kv2 y Kv4 (Figura I.20D) (Wible y cols., 1998; Kuryshev y cols., 2000).

• Subunidades KChIP

Las subunidades auxiliares KChIP (*Kv Channel Interacting Protein*) son proteínas citosólicas relacionadas con la familia de sensores neuronales de Ca^{2+} . Se han identificado cuatro subunidades KChIP (KChIP1 a KChIP4) y diversas isoformas de varias de ellas. Estas subunidades se unen al extremo N-terminal de las subunidades α con una estequiometría 1:1 (Figura I.20B) (Kim y cols., 2004b). La mayoría de las proteínas KChIP modifican la

actividad del canal afectando a la cinética de inactivación y/o de recuperación de la inactivación (An y cols., 2000; Decher y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Wang y cols., 2007). Su distribución es heterogénea, siendo las isoformas KChIP2a, KChIP2b y KChIP2c las predominantes en el corazón (An y cols., 2000; Ohya y cols., 2001; Patel y cols., 2002; Decher y cols., 2004a), donde se unen a las subunidades α Kv4.2 y Kv4.3 para regular su expresión en membrana y modular las propiedades cinéticas de la I_{to1} (An y cols., 2000).

- *Subunidades DPPX*

Las proteínas dipeptidilpeptidasas (DPP) pertenecen a la familia de serín-proteasas no clásicas y son glicoproteínas de membrana con un largo extremo C-terminal extracelular (Wada y cols., 1992). El primer miembro identificado de esta familia fue la proteína DPP6 (Figura I.20B), del que se ha sugerido que tiene como función regular la cinética y el tráfico a la membrana de los canales Kv4 (Kin y cols., 2001; Nadal y cols., 2003), con los que interacciona siguiendo una estequiometría 1:1 (Soh y Goldstein, 2008). En neuronas, se ha propuesto que la corriente transitoria de K^+ (I_A) estaría formada por un complejo ternario 4:4:4 formado por subunidades α Kv4 y subunidades auxiliares DPP6 y KChIP (Maffie y Rudy, 2008). Su presencia en el miocardio humano permite aventurar la formación de dicho complejo también en el corazón para generar la I_{to1} (Radicke y cols., 2005). Además, se ha demostrado que otro miembro de esta familia, la proteína DPP10, interacciona con los canales Kv4 en neuronas (Jerng y cols., 2004; Li y cols., 2006), por lo que su presencia en el miocardio sugiere que podría formar parte de los canales que generan la I_{to1} (Radicke y cols., 2007).

2.3.3.b. *La inactivación de los canales Kv*

El estado inactivo es un estado no conductor que la mayoría de los canales Kv alcanzan tras su activación, aunque puede alcanzarse desde el estado cerrado o sin que el canal se abra (Rasmusson y cols., 1998; Kurata y Fedida, 2006). Tanto la inactivación como la recuperación de la misma son fundamentales para determinar la contribución de cada una de las corrientes de K^+ a la repolarización cardíaca. Sin embargo, no existe un único mecanismo responsable de la inactivación, sino que es un proceso que presenta propiedades diferentes dependiendo del canal estudiado.

• Inactivación tipo-N

La inactivación tipo-N se conoce como “modelo de la bola y la cadena”, ya que una secuencia de aproximadamente 20 aminoácidos del extremo N-terminal (bola), que se encuentra unida al canal a través del dominio formado por el resto de aminoácidos hasta el segmento S1 (cadena), ocluye el poro intracelular del canal e impide el paso de los iones (Figura I.21A) (Zagotta y cols., 1990; Isacoff y cols., 1991; MacKinnon y cols., 1993; Gómez-Lagunas y Armstrong, 1995; Lee y cols., 1996). Este mecanismo es un proceso de inactivación muy rápido (1-10 ms), por lo que también se conoce como “inactivación rápida” y se produce en canales de la familia *Shaker* (Kv1.1 y Kv1.4), *Shal* (Kv4.2 y Kv4.3) y *Shaw* (Kv3.1-3.4) (Coetzee y cols., 1999).

Se ha determinado que existen alrededor de 10 aminoácidos hidrofóbicos seguidos de una serie de aminoácidos con una carga neta positiva que determinan la inactivación tipo-N. Gracias a estos datos se ha postulado que los residuos hidrofóbicos del dominio de inactivación pueden interactuar directamente con regiones hidrofóbicas del canal, probablemente en la región que une los segmentos S4 y S5 (Isacoff y cols., 1991). Pero no siempre la inactivación tipo-N se produce a través de la secuencia descrita, ya que existen subunidades reguladoras, como las subunidades β , que pueden interaccionar con canales, como en el caso del canal Kv1.1, dando lugar a la inactivación tipo-N de los mismos (MacKinnon y cols., 1993; Rettig y cols., 1994).

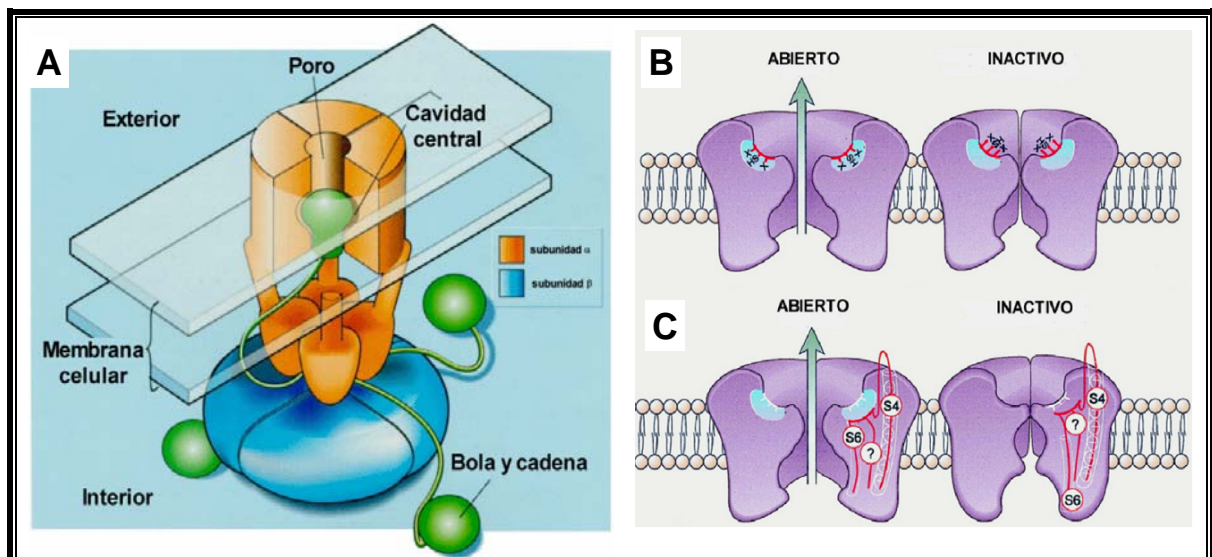


Figura I.21. Modelos de inactivación de los canales Kv. (A) Modelo de “la bola y la cadena”. **(B-C)** Modelo de inactivación tipo-C: cambios conformacionales en la boca externa del poro asociados a la inactivación tipo-C **(B)** y cambios conformacionales adicionales que tienen lugar durante este tipo de inactivación **(C)**, asociados fundamentalmente al S6. [Adaptadas de Aldrich, 2001 (A) y Rasmusson y cols., 1998 (B-C)]

Una importante característica de este tipo de inactivación es su sensibilidad al bloqueo por TEA y por pancuronio, sólo cuando son aplicados en la cara intracelular del poro (Choi y cols., 1991).

- *Inactivación tipo-C*

La eliminación de la inactivación rápida tipo-N dejó en evidencia la presencia de un proceso inactivante lento al que se denominó inactivación tipo-C, puesto que inicialmente se pensó que dependía específicamente del extremo C-terminal del canal (Figuras I.21B y C) (Choi y cols., 1991; Hoshi y cols., 1991). Posteriormente se ha demostrado que esta inactivación depende de cambios conformacionales en la boca externa del poro que implican también la participación del filtro de selectividad (López-Barneo y cols., 1993; Rasmusson y cols., 1998)

La inactivación tipo-C, al igual que la inactivación tipo-N, es independiente de voltaje a potenciales a los que la activación es completa, lo que sugiere que están acopladas a la activación (Hoshi y cols., 1990; Rasmusson y cols., 1995). Además, la recuperación de ambos tipos de inactivación es voltaje dependiente, debido al descenso del segmento S4 (Rasmusson y cols., 1995).

Sin embargo, la inactivación tipo-C se puede diferenciar fácilmente de la tipo-N ya que no es sensible a la perfusión intracelular con TEA (Hoshi y cols., 1991; López-Barneo y cols., 1993) y es sensible a la concentración y naturaleza del catión permeable en el medio extracelular (MacKinnon y Yellen, 1990). La cinética de la inactivación tipo-C se retrasa al aumentar la $[K^+]_e$, debido a la interacción del K^+ con un sitio de alta afinidad situado en la cara externa del poro iónico del canal, que impide que se produzca el cierre de la boca del canal, retrasando la inactivación (López-Barneo y cols., 1993). Este mecanismo se conoce como “pie en la puerta”. Otra diferencia fundamental es que mientras que los dominios inactivantes tipo-N actúan independientemente, las cuatro subunidades del canal actúan de manera cooperativa en la inactivación tipo-C (Ogielska y cols., 1995; Panyi y cols., 1995).

2.3.3.c. Principales corrientes generadas a través de canales Kv que intervienen en el PA cardíaco

Gracias a estudios realizados con la técnica de *patch-clamp* en miocitos auriculares y ventriculares, se han identificado al menos cuatro corrientes de K^+ generadas a través de canales Kv implicadas en el PA cardíaco: la I_{to1} , la I_{Kur} , la I_{Kr} y la I_{Ks} .

I. La I_{to}

La corriente transitoria de salida de K^+ está formada en realidad por dos componentes bien diferenciados, la I_{to1} y la I_{to2} , donde sólo la I_{to1} es una corriente de K^+ , ya que la I_{to2} es una corriente de Cl^- activada por Ca^{2+} (Siegelbaum y cols., 1977; Kenyon y Gibbons, 1979; Coraboeuf y Carmeliet, 1982; Hiraoka y Kawano, 1989). La I_{to1} es responsable de la rápida repolarización del PA durante la fase 1, por lo que determina la altura y la duración de la fase de meseta (Nerbonne, 2000; Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010).

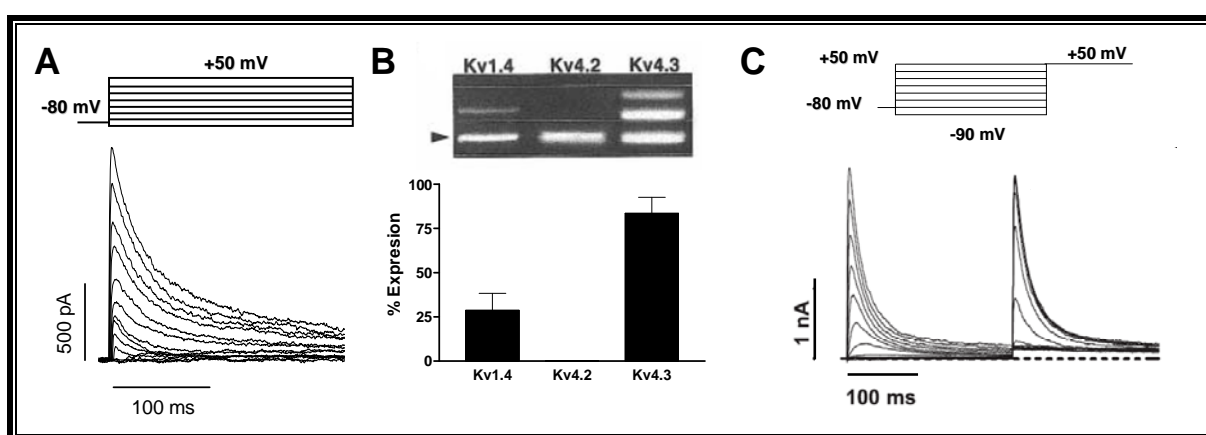


Figura I.22. Características de la I_{to1} . (A) I_{to1} registrada en miocitos auriculares humanos en nuestro laboratorio tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. (B) Detección por PCR de los distintos tipos de canales que generan la I_{to1} auricular humana (panel superior) y representación de la expresión relativa de su ARNm (panel inferior). En el panel superior, la flecha corresponde a la banda de control interno. (C) Corriente generada por canales Kv4.3 registrada en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. [Adaptadas de Caballero y cols., 2010 (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Amorós y cols., 2010 (C)]

I.a. Características de la I_{to1}

La I_{to1} se activa (alcanza su máxima amplitud en 5-20 ms) e inactiva muy rápidamente (Figura I.19), siendo su reactivación también muy rápida (≈ 50 ms) (Litovsky y Antzelevitch, 1988; Fermini y cols., 1992). Existen dos fenotipos de corriente transitoria: una I_{to1} lenta ($I_{to1,s}$) y una I_{to1} rápida ($I_{to1,f}$). Ambos fenotipos se pueden distinguir en función de sus propiedades biofísicas, moleculares y farmacológicas (Nerbonne y Kass, 2005).

La amplitud de la I_{to1} es dependiente de la frecuencia cardíaca, por lo que su papel en la DPA es más importante a frecuencias cardíacas lentas. Además, en las células en las que coexiste con las corrientes de K^+ rectificadoras tardías, la inhibición de la I_{to1} desplaza la fase 2 del PA hacia valores más positivos, lo que acelera la activación de las corrientes de salida

de K^+ , dando como resultado un acortamiento de la DPA (Fermini y cols., 1992; Carmeliet, 1993; Courtemanche y cols., 1999; Burashnikov y cols., 2004).

En el miocardio humano, la densidad de la I_{to1} es ≈ 6 veces mayor en el tejido auricular y en las fibras de Purkinje que en el ventrículo. Y mientras que en la aurícula no hay diferencias en la densidad de la I_{to} entre la aurícula derecha (AD) y la aurícula izquierda (AI) (Caballero y cols., 2010a), dentro del ventrículo la I_{to1} presenta un gradiente transmural de expresión (epicardio > células M > endocardio, siendo $\approx 3-4$ veces mayor en el epicardio que en el endocardio) (Wettwer y cols., 1994; Näbauer y cols. 1996). Además, se observa un patrón de expresión para los dos fenotipos de la I_{to1} según la región del miocardio que se estudia: la $I_{to1,s}$ se expresa fundamentalmente en regiones que presentan una DPA más prolongada (endocardio, ventrículo izquierdo, septo y ápex), mientras que la $I_{to1,f}$ se expresa mayoritariamente en regiones epicárdicas, ventrículo derecho y en la base del corazón (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010).

I.b. Composición de los canales que generan la I_{to1}

Se han identificado tres subunidades α como posibles responsables de los diferentes fenotipos de la I_{to1} (Kv1.4, Kv4.2 y Kv4.3), aunque las diferencias observadas entre la corriente generada por cada una de estas subunidades α y las corrientes nativas sugieren la participación adicional de una o varias subunidades auxiliares.

- Composición de la $I_{to1,s}$

Debido a las propiedades biofísicas, moleculares y farmacológicas que presenta la corriente generada por las subunidades α Kv1.4, se ha propuesto que son las responsables de la $I_{to1,s}$ (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010). El canal formado por 4 subunidades α Kv1.4 reproduce casi todas las propiedades de la $I_{to1,s}$ salvo la activación, por lo que se ha sugerido su ensamblaje con alguna subunidad β , posiblemente las subunidades Kv β 1 y/o Kv β 2 (Morales y cols., 1995; Serodio y cols., 1996).

- Composición de la $I_{to1,f}$

Las subunidades α Kv4.2 y Kv4.3 generan una corriente cuyas características biofísicas, moleculares y farmacológicas coinciden con las observadas en la $I_{to1,f}$ nativa (Oudit y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004b; Niwa y Nerbonne, 2010). En el corazón humano, las subunidades α Kv4.3 son las responsables de la $I_{to1,f}$ (Dixon y cols., 1996; Kong y cols., 1998;

Dilks y cols., 1999), aunque la corriente generada a través de estos canales no reproduce completamente las propiedades de la corriente nativa (Beuckelmann y cols., 1993; Wettwer y cols., 1993 y 1994; Näbauer y cols., 1993 y 1996; Amos y cols., 1996; Kong y cols., 1998), lo que sugiere la participación de subunidades auxiliares.

Las primeras subunidades que se relacionaron con la modulación de la $I_{to,f}$ fueron las subunidades KChIP, concretamente la KChIP2 (Bähring y cols., 2001; Kuo y cols., 2001; Rosati y cols., 2001). De hecho, se ha demostrado que los ratones KChIP2^{-/-} no presentan $I_{to1,f}$ (Kuo y cols., 2001). Además, el ARNm de KChIP2 en el hombre y en el perro es ≈ 25 veces más abundante en el epicardio que en el endocardio, lo que sugiere que la KChIP2 podría jugar un papel importante en el gradiente transmural de la I_{to1} (Rosati y cols., 2001; Zicha y cols., 2004).

También se ha descrito que las proteínas minK y MiRP modulan las propiedades de los canales Kv4.2 y Kv4.3 (Zhang y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002; Lundby y Olesen, 2006; Radicke y cols., 2006 y 2008; Delpón y cols., 2008). Por otro lado, las glicoproteínas DPP6 y DPP10 regulan y se coexpresan con los canales Kv4.2 y Kv4.3 en neuronas (Nadal y cols., 2003; Jerng y cols., 2004; Li y cols., 2006), por lo que su presencia en el miocardio humano sugiere también su posible participación en la $I_{to1,f}$ (Radicke y cols., 2005 y 2007). Por último, las subunidades Kv β 1, Kv β 2, KChAP y Nav β 1 también son capaces de modular los canales Kv4.2 y Kv4.3 *in vitro* (Wible y cols., 1998; Pérez-García y cols., 1999; Kuryshev y cols., 2000; Yang y cols., 2001; Deschênes y Tomaselli, 2002; Deschênes y cols., 2008).

I.c. La I_{to1} en diversas patologías

En situaciones como la insuficiencia cardíaca, la hipertrofia cardíaca, la isquemia miocárdica y el infarto de miocardio se produce una prolongación de la DPA (Kääb y cols., 1998; Tomaselli y Marbán, 1999; Oudit y cols., 2001). En la hipertrofia cardíaca, esta prolongación se correlaciona con una disminución de la I_{to1} y de los niveles de ARNm de Kv4.2 y Kv4.3 (Potreau y cols., 1995; Meszaros y cols., 1996). También se ha descrito una disminución de la I_{to1} y de los niveles de ARNm de Kv4.2 y Kv4.3 tras un infarto de miocardio (Kaprielian y cols., 1999; Huang y cols., 2000). De igual forma, tanto la corriente I_{to1} como la expresión de Kv4.3 se encuentran significativamente disminuidas en pacientes con FA (Van Wagoner y cols., 1997; Bosch y cols., 1999; Grammer y cols., 2000; Caballero y cols., 2010a). Es más, nuestro grupo ha descrito que la FA crónica (FAC) promueve una mayor disminución de la amplitud y de la densidad de la I_{to1} en la AI que en la AD (Figura

I.23). Por lo tanto en los pacientes con FAC se crea un gradiente de I_{to1} AD-AI que como habíamos comentado anteriormente no existe en RS. Es decir, la FAC aumenta la diferencia interauricular de la I_{to1} (Caballero y cols., 2010a).

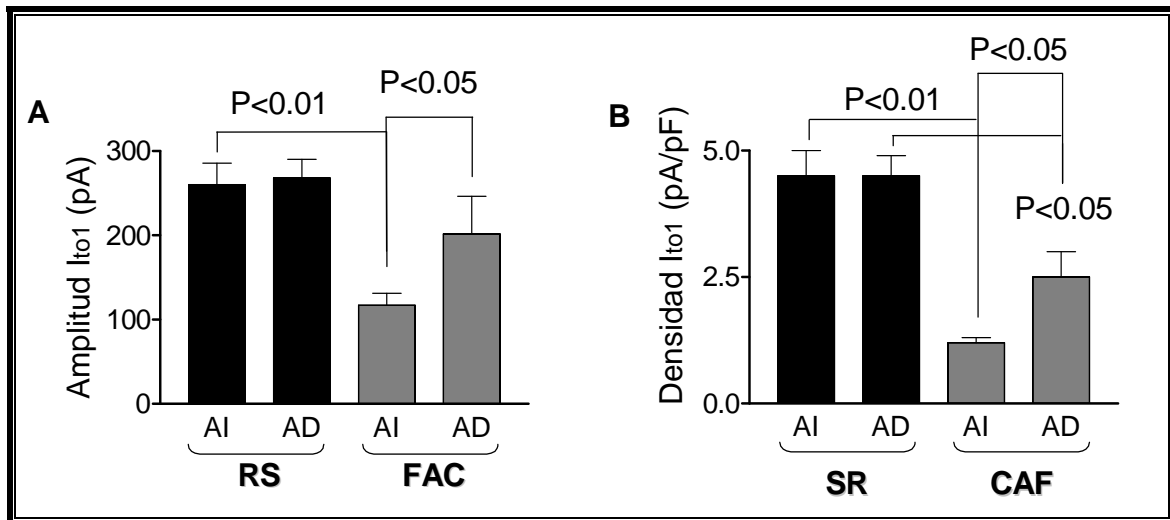


Figura I.23. Distribución auricular de la I_{to1} . (A) Amplitud de I_{to1} registrada a +30 mV en miocitos de orejuela izquierda (AI) y derecha (AD) procedentes de pacientes en RS y con FAC. (B) Densidad de I_{to1} registrada a +30 mV en miocitos de orejuela izquierda (AI) y derecha (AD) procedentes de pacientes en RS y con FAC (Caballero y cols., 2010a).

II. La I_{Kur}

Las células auriculares presentan una corriente de salida de K^+ que se activa en el rango de potenciales de la fase de meseta del PA y que presenta rectificación y una lenta inactivación, y que se denomina corriente rectificadora tardía de activación ultrarrápida o I_{Kur} (Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Amos y cols., 1996; Feng y cols., 1998a). La I_{Kur} se ha registrado en el tejido auricular, pero no en el tejido ventricular humano (Figura I.25A), aunque sí que se ha detectado en el ventrículo de otras especies como el ratón y el cobayo (Wang y cols., 1993; Nattel y cols., 1999a). Por ello la I_{Kur} , junto con la I_{to1} , contribuyen a que la DPA en la aurícula sea más breve que en el ventrículo (Feng y cols., 1998b; Tamargo y cols., 2009) y además se ha propuesto como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de arritmias auriculares (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002; Tamargo y cols., 2009).

Recientemente nuestro grupo ha demostrado que los miocitos humanos de la AD y de la AI procedentes de pacientes en RS son eléctricamente heterogéneos (Caballero y cols., 2010a). Aproximadamente el 35% de los miocitos de las muestras auriculares de pacientes en

RS mostraron una corriente de salida de K^+ compuesta por un componente de rápida activación e inactivación identificada como la I_{to1} (Figura I.24A).

En el 20% de las células no existía I_{to1} , pero aparecía un componente de rápida activación y que no inactivaba formado en su mayor parte por I_{Kur} (Figura I.24A). En el 45% de las células restantes se detectó un patrón intermedio, es decir, las células mostraban tanto I_{to1} como I_{Kur} (Figura I.24A). Esta heterogeneidad estaba acompañada también por diferencias en el tamaño celular (las células I_{to1} predominantes eran más pequeñas que las I_{Kur} predominantes). Es importante destacar que la distribución de los tres tipos celulares era idéntica en ambas aurículas (Figura I.24B) (Caballero y cols., 2010a). Sin embargo, en cuanto a la densidad de la I_{Kur} se observó un gradiente AD-AI, puesto que la densidad de la I_{Kur} era significativamente mayor en la AD que en la AI (Figura I.28A).

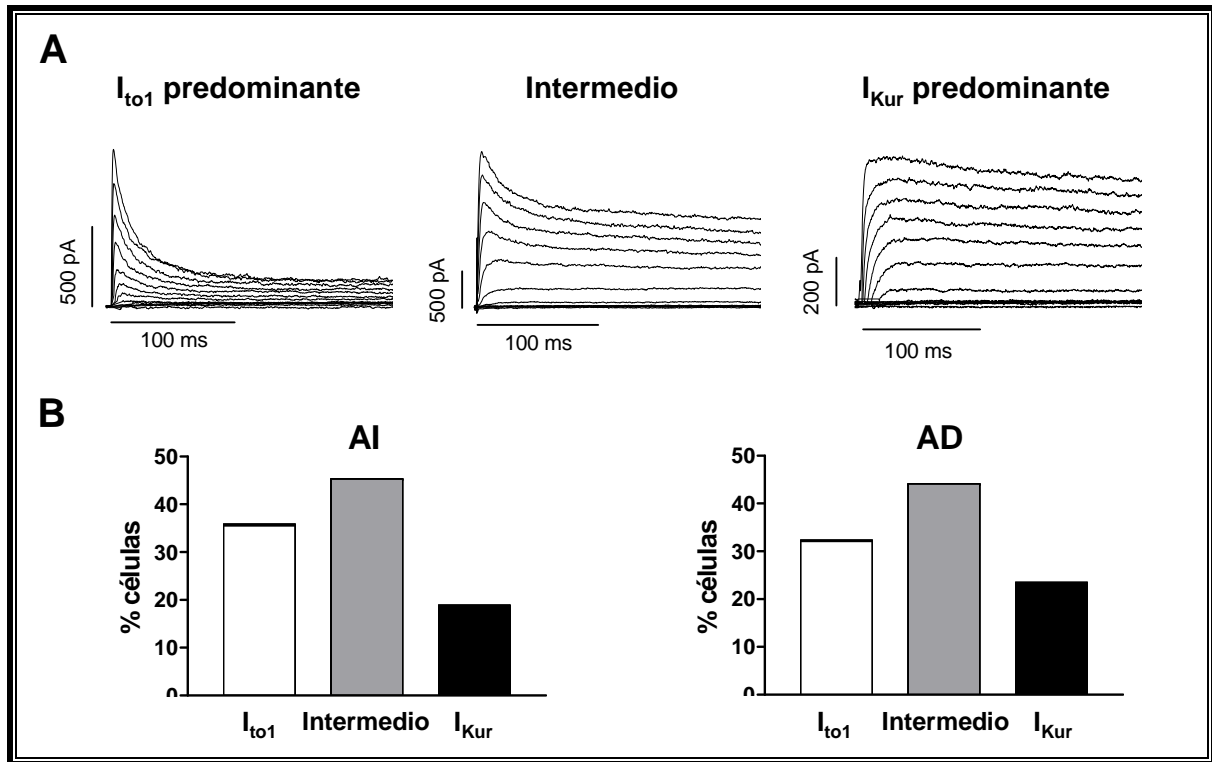


Figura I.24. Tipos celulares identificados en miocitos auriculares procedentes de pacientes en RS. (A) Familias de trazos registrados en tres células diferentes obtenidas de muestras de aurícula derecha (AD) y procedentes de un paciente en RS. **(B)** Porcentaje de células con patrón I_{to1} predominante, intermedio e I_{Kur} predominante en aurícula izquierda (panel izquierdo) y aurícula derecha (panel derecho). [Modificada de Caballero y cols., 2010a].

II.a. Características de la I_{Kur}

La I_{Kur} se activa rápidamente y presenta una inactivación parcial o incluso no presenta inactivación alguna durante el curso temporal del PA (Figura I.25A). El canal a través del cual

se genera la I_{Kur} es altamente selectivo para el K^+ , siendo el cociente $P_{Na}:P_K \approx 0.007$. La I_{Kur} se activa rápidamente con una cinética voltaje-dependiente que presenta una constante de tiempo <10 ms a temperatura ambiente. Como la activación de la I_{Kur} se acelera al aumentar la temperatura, la activación fisiológica es extremadamente rápida (Wang y cols., 1993).

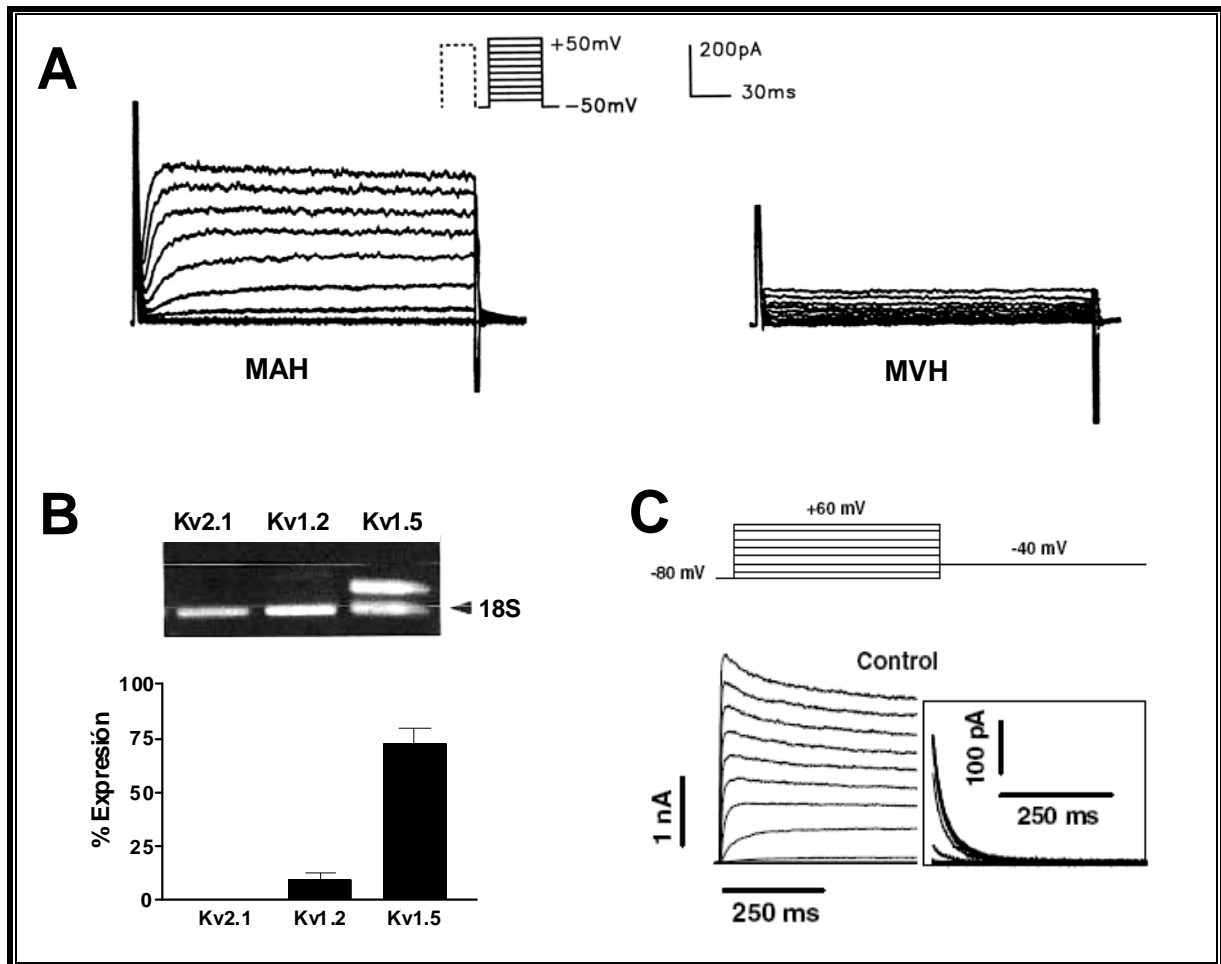


Figura I.25. Características de la I_{Kur} . (A) I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos (MAH) y en miocitos ventriculares humanos (MVH) tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. (B) Detección por PCR de canales Kv que generan corrientes tipo I_{Kur} en muestras auriculares humanas (panel superior) y representación de la expresión relativa del ARNm de cada uno (panel inferior). (C) Corriente generada por canales Kv1.5 humanos expresados en células *Ltk* tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior de la figura. [Adaptadas de Li y cols., 1996b (A), Bertaso y cols., 2002 (B) y Gómez y cols., 2005 (C)]

La activación del canal no se produce instantáneamente tras la despolarización de la membrana sino que existe un pequeño retraso debido a la transición del mismo por diversos estados no conductores (C) antes de abrirse (A), dando lugar a corrientes con una cinética de activación rápida y sigmoidal (Snyders y cols., 1993). En 1998, Rych y Snyders propusieron un modelo cinético para el canal hKv1.5 que asumía la existencia de varios estados cerrados, abiertos e inactivos: $C_n \leftrightarrow C_{n-1} \leftrightarrow \dots \leftrightarrow A_1 \leftrightarrow A_2 \leftrightarrow I_1 \leftrightarrow I_2$, siendo la transición hacia el último estado abierto el determinante del grado de inactivación.

Dada la lentitud de la inactivación de la I_{Kur} a temperatura ambiente, puede considerarse como una “corriente sostenida”, sin embargo la inactivación se acelera a temperaturas fisiológicas (Apkon y Nerbonne, 1991; Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Li y cols., 1996a; Tamargo y cols., 2004b). Además, también es lenta la recuperación de la inactivación, lo que tiene gran importancia para explicar la dependencia de frecuencia de la amplitud de la I_{Kur} en los rangos fisiológicos de frecuencia (Feng y cols., 1998a y b). Se ha propuesto que el mecanismo de inactivación de la I_{Kur} es de tipo-C, como resultado de los cambios conformacionales en la boca externa del poro de las cuatro subunidades α (Tamargo y cols., 2004b). Esta inactivación tipo-C es independiente de voltaje y en los canales *Shaker* se retrasa en presencia de TEA extracelular (Choi y cols., 1991), al aumentar la concentración extracelular de K^+ o cuando el residuo Thr449, situado en la boca externa del poro, es sustituido por una Val o una Tyr (López-Barneo y cols., 1993). Sin embargo, datos experimentales demostraron que en los canales Kv1.5 el aumento de la concentración extracelular de K^+ aumenta ligeramente la amplitud del componente inactivante sin modificar la constante de tiempo del proceso (Delpón y cols., 1999). Además como los canales Kv1.5 no presentan inactivación tipo-N puesto que poseen un N-terminal pequeño (Snyders y cols., 1993), es posible que estos canales se inactiven a través de un mecanismo no tipo-N no tipo-C (Delpón y cols., 1999).

Las principales características biofísicas de la I_{Kur} registrada en miocitos humanos, de perro, de ratón y de rata se resumen en la Tabla I.10:

Especie	V_h Act (mV)	τ Act (ms)	V_h Inac (mV)	τ Inac (ms)	Densidad (pA/pF, 10mV)	Referencias
Ratón (V)	- 12.5	3.8-2.1(23°C) (-20 a +50mV)	-35.1	30-600 ms (23°C)	8-30	Fiset y cols., 1997 Zhou y cols., 1998a
Rata (A)	- 1.5	5.3-1.4 (-10 a +50mV)	-41	650 ms	5	Boyle y Nerbonne, 1991 Van Wagoner y cols., 1996
Rata (V)	-	50-10 (22°C) (-20 a +60 mV)	-69	1.2 s	4	Apkon y Nerbonne, 1991
Perro (A)	6.9	19.3-1.7 (22°C) (-10 a +60mV)	-	0.6-5.6 s (23°C)	4	Yue y cols., 1996
Humano (A)	- 4.3, 3.5	17.7-1.9 (22°C) (-10 a +50mV)	-7.5 (36°C) -23.1 (22°C)	1-6.8 s (36°C) 2.3-22.2 s (22°C)	3 (36°C) 7 (22°C)	Wang y cols., 1993 Feng y cols., 1998a Amos y cols., 1996

Tabla I.10. Propiedades biofísicas de la I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos y en diversos animales. A: Aurícula. Act: Activación. Inac: Inactivación. V: Ventrículo. [Modificada de Nattel y cols., 1999a].

II.b. Composición de los canales que generan la I_{Kur}

Se han clonado diversos genes que codifican canales con las características de la corriente rectificadora ultrarrápida como Kv1.2, Kv1.5, Kv2.1 y Kv3.1. La principal diferencia entre estos canales son sus propiedades farmacológicas, en particular la sensibilidad a la 4-aminopiridina (4-AP), al TEA, a la dendrotoxina (DTX) y a la caribdotoxina (CTX), tal y como se recoge en la Tabla I.11.

<u>Canal</u>	<u>4-AP (μM)</u>	<u>TEA (mM)</u>	<u>DTX (nM)</u>	<u>CTX (nM)</u>	<u>Referencias</u>
Kv1.2	200-800	10-560	1-17	14	Grissmer y cols., 1994 Roberds y cols., 1993 Mathie y cols., 1998
Kv1.5	100-270	330	>200	>100	Grissmer y cols., 1994 Roberds y cols., 1993 Mathie y cols., 1998 Snyders y cols., 1993 Philipson y cols., 1991
Kv2.1	500	6-10	-	-	Grissmer y cols., 1994 Mathie y cols., 1998
Kv3.1	29	0.1-0.2	>1000	>1000	Grissmer y cols., 1994 Mathie y cols., 1998
<u>I_{Kur}</u>					
Ratón (V)	15-32	Sin efecto	Sin efecto	-	Fiset y cols., 1997 Zhou y cols., 1998a
Rata (A)	1000	>50	5	-	Boyle y Nerbonne, 1991 Van Wagoner y cols., 1996
Rata (V)	10000	<50	-	-	Apkon y Nerbonne, 1991
Perro (A)	5.3	0.31	Sin efecto	Sin efecto	Yue y cols., 1996 Scamps, 1996
Humano (A)	6-50	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	Wang y cols., 1993 Feng y cols., 1998a Amos y cols., 1996

Tabla I.11. Valores de concentraciones inhibitorias 50 para los distintos fármacos en canales clonados y en corrientes nativas registradas en diferentes especies. [Modificada de Nattel y cols., 1999b].

La sensibilidad a la 4-AP y la resistencia al TEA y a la DTX de la I_{Kur} de ratón y humana parecen indicar que es la subunidad Kv1.5 la responsable de generar esta corriente en ambas especies (Nattel y cols., 1999b). Además, en miocitos auriculares humanos cultivados en los que se usan oligonucleótidos antisentido (AsODN, *Antisense oligonucleotides*) contra el ARNm de la subunidad Kv1.5, no se registra la I_{Kur} , confirmando el papel de Kv1.5 en la génesis de la corriente nativa (Feng y cols., 1997b). Sin embargo, la gran sensibilidad a 4-AP y a TEA de la I_{Kur} en el perro parece indicar que la subunidad que la genera es la Kv3.1 y la gran sensibilidad por el DTX de la corriente en aurícula de rata hace pensar en un posible papel para la subunidad Kv1.2. Por último, la moderada sensibilidad al TEA de la corriente

registrada en miocitos ventriculares de rata hace que sea compatible con la corriente generada a través de la subunidad Kv2.1.

La proteína Kv1.5 contiene 613 aminoácidos y forma la subunidad α del canal que genera la I_{Kur} (conductancia: 10-14 pS) y está codificada por el gen KCNA5. La expresión de la proteína Kv1.5 en un sistema heterólogo permite registrar una corriente rectificadora tardía con las características biofísicas y farmacológicas de la I_{Kur} . La proteína Kv1.5 se expresa en igual proporción tanto en aurícula como en ventrículo humano (Fedida y cols., 1993) aunque, como se ha mencionado, sólo forma canales funcionales en la aurícula (Roberds y Tamkun, 1991; Wang y cols., 1993).

• Subunidades reguladoras

Se ha descrito que los canales de la familia Kv1.x, tales como el canal Kv1.5, se asocian con diversos miembros de la familia de proteínas Kv β . Éstas se unen mediante su C-terminal al N-terminal de la subunidad α para formar complejos $\alpha\beta_4$ (England y cols., 1995; Roden y cols., 2002). En el miocardio de distintas especies se ha demostrado la expresión de las subunidades Kv β 1 y Kv β 2 (McCormack y cols., 1999). En la aurícula humana, parece ser que la subunidad Kv β 1.2 es la que se asocia a los canales Kv1.5 regulando la actividad de los mismos (Martens y cols., 1999). La coexpresión de la subunidades Kv β 1.2 y Kv β 1.3 con la subunidad α Kv1.5 acelera la inactivación aumentando el grado de inactivación, retrasa la deactivación y desplaza la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales más negativos (Martens y cols., 1999). Estos efectos no se producen tras la activación de la proteína quinasa A (PKA) ni tampoco tras la incubación con un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC), la calfostina C (Kwak y cols., 1999). Estas subunidades reguladoras también pueden modificar el bloqueo del canal Kv1.5 por diversos fármacos. Así, la asociación Kv1.5 y Kv β 1.3 hace que el canal sea menos sensible al bloqueo por quinidina o por bupivacaína (González y cols., 2002).

Por otra parte, la asociación de la subunidad Kv β 2.1 con canales Kv1.5 disminuye la expresión de los canales en la membrana y desplaza el punto medio de las curvas de activación e inactivación hacia potenciales más negativos pero no modifica ni la cinética de inactivación ni la de deactivación (Uebele y cols., 1996; Accili y cols., 1997).

Sin embargo, y a pesar de todos los datos anteriormente expuestos, el papel de las subunidades accesorias Kv β sobre la corriente auricular I_{Kur} no está del todo claro. De hecho, se ha demostrado que no existe una asociación entre el canal Kv1.5 y Kv β 1 en miocitos ventriculares de ratón y en ratones *knockout* Kv β 1^{-/-} la I_{Kur} no se ve modificada (Aimond y

cols., 2005). Por lo tanto, no se descarta que otras subunidades $Kv\beta$ estén implicadas en la estructura molecular de los canales que genera la I_{Kur} .

II.c. Regulación de la I_{Kur}

El canal $Kv1.5$ y las subunidades $Kv\beta$ poseen múltiples sitios consenso de fosforilación para la PKA y la PKC. En miocitos auriculares humanos la I_{Kur} está regulada tanto por la estimulación α - como β -adrenérgica, que presentan efectos opuestos (Li y cols., 1996; Nattel y cols., 1999a). La I_{Kur} registrada en miocitos auriculares procedentes de pacientes tanto en RS como con FA, no se ve modificada por el isoproterenol a la concentración de 1 nM (Figura I.26; González de la Fuente y cols., 2013), pero la aumenta cuando se emplean concentraciones mayores de 10 nM (Li y cols., 1996b). Este efecto es mimetizado por la estimulación directa de la adenilil ciclasa (AC) y suprimido por un péptido inhibidor de la PKA. En presencia de propranolol, la fenilefrina inhibe la I_{Kur} y esta inhibición desaparece en presencia del inhibidor de la PKC bisindolilmaleimida (Li y cols., 1996b).

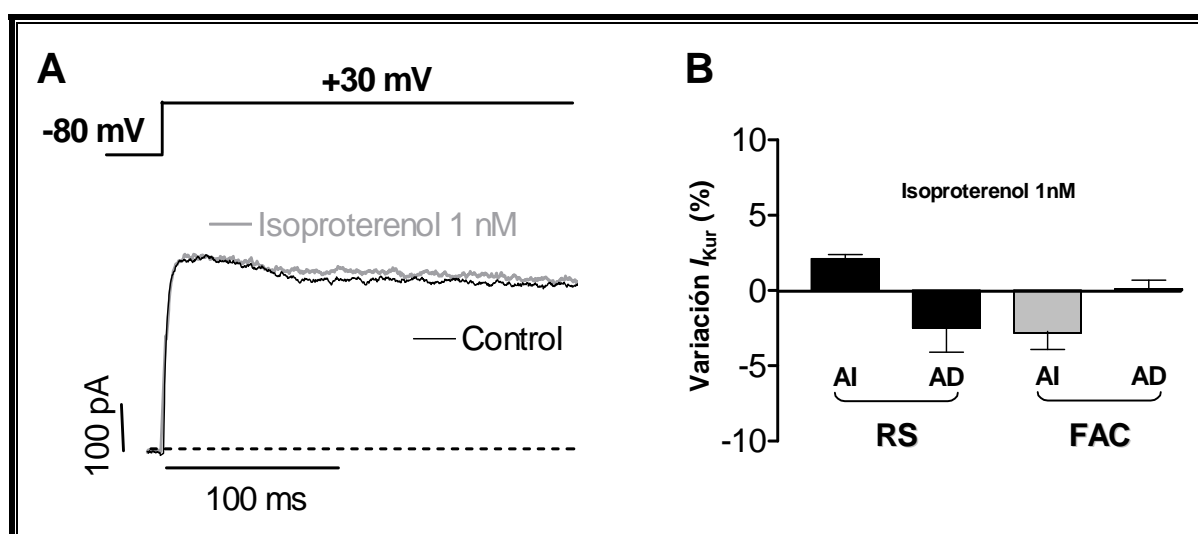


Figura I.26. Efectos del isoproterenol sobre la I_{Kur} . (A) I_{Kur} registrada tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior en un miocito auricular disociado de una muestra de orejuela derecha procedente de un paciente en RS en ausencia y en presencia de isoproterenol a la concentración de 1 nM. (B) Efectos del isoproterenol 1 nM sobre la I_{Kur} registrada a +30 mV en miocitos procedentes de orejuela izquierda (AI) y derecha (AD) de pacientes en RS y con FAC (González de la Fuente y cols., 2013).

Distintos estudios indican que la coexpresión de $Kv\beta1.3$ con el canal $Kv1.5$ es necesaria para el aumento de la corriente mediado por PKA (Kwak y cols., 1999) mientras que la subunidad $Kv\beta1.2$ aumenta el efecto inhibitorio de la PKC sobre la corriente (Williams y cols., 2002).

La coexpresión de los canales Kv1.5 con receptores que estimulan la fosfolipasa C (PLC), como el receptor humano de la trombina y el 5-HT_{1c}, inhibe la amplitud de la I_{Kur} sin modificar la cinética ni la dependencia de voltaje de la activación (Timpe y Fantl, 1994). La aplicación simultánea del inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y un análogo de diacilglicerol (DAG) reproduce la modulación recién comentada, sugiriendo que la activación de la PLC y su cascada intracelular pueden modular el canal Kv1.5.

El canal hKv1.5 se puede asociar mediante una secuencia rica en prolina de la región N-terminal con el dominio SH de la tirosina quinasa Src. Así la coexpresión de Kv1.5 con Src promueve la fosforilación del canal y la inhibición de la corriente (Holmes y cols., 1996).

Los canales Kv1.5 también pueden ser regulados por el NO a través de la vía GMPc/PKG. Además la nitrosilación directa de las Cys331 y 346 del canal contribuye al efecto inhibitorio del NO, que es aparente a concentraciones fisiológicas miocárdicas del mismo (Núñez y cols., 2006).

En cuanto a la expresión en membrana de los canales Kv1.5, existen diversos factores capaces de modificar su expresión. Dichos factores aparecen recogidos en la Tabla I.12.

Factores que reducen la expresión de Kv1.5	Factores que aumentan la expresión de Kv1.5
Despolarización de la membrana Acidosis extracelular Fenilefrina Hipotiroidismo	Dexametasona AMPc Mecanismos de stretching Hipertiroidismo

Tabla I.12. Factores que modifican la expresión del canal Kv1.5 (Mori y cols., 1993; Takimoto y Levitan, 1994; Mubagwa y cols., 1994; Levitan y cols., 1995; Nishiyama y cols., 1997; Guo y cols., 1998; Nattel y cols., 1999).

II.d. Propiedades farmacológicas de la I_{Kur}

La I_{Kur} es una corriente relativamente insensible a TEA, Ba²⁺ y a inhibidores de la I_{Kr} (dofetilida, E-4031 y MK-499), pero es muy sensible a concentraciones bajas de 4-AP (Snyders y cols. 1993; Wang y cols. 1993; Grissmer y cols., 1994; Wang y cols., 1995b; Feng y cols., 1997a; Tamargo y cols., 2009).

Fármaco	I_{Kur}	Kv1.5	Especie	Referencia
4-AP	50 μ M	180 μ M	MAH, Ltk	Wang y cols., 1995b Grissmer y cols., 1994
Ambasilida	34-45 μ M		MAH, MAP	Koidl y cols., 1996 Yue y cols., 2000
Amiodarona		10 μ M (7%)	HEK	Kobayashi y cols., 2001
Atorvastatina		4.5 μ M	Ltk	Vaquero y cols., 2007
Azimilida	100 μ M (39%)		MAH	Chen y cols., 2002
Bepiridilo		6.5 μ M	HEK	Kobayashi y cols., 2001
Benzocaína		901 μ M	Ltk	Delpón y cols., 1999
Bupivacaína		6.6-8.9 μ M	Ltk	González y cols., 2001
Candesartán		0.1 μ M (21%)	Ltk	Caballero y cols., 2001
Ac. Canrenólico		173 μ M	Ltk	Gómez y cols., 2005
Carvedilol		2.56 μ M	CHO	Jeong y cols., 2012a
Cisaprida		21.2 μ M	HEK	Rampe y cols., 1997
Clofilio		140-840 nM	CHO	Malayev y cols., 1995
Descarboetoxi-loratadina		12 μ M	Ltk	Caballero y cols., 1997
Diltiazem	11.2 μ M	115 μ M	MAH, MEL	Grissmer y cols., 1994; Gao y cols., 2005; Caballero y cols., 2004
E-4031		< 10 μ M	HEK	Kobayashi y cols., 2001
Ebastatina		3 μ M (13%)	Ltk	Valenzuela y cols., 1997a
Eprosartán		1 μ M (14%)	Ltk	Caballero y cols., 2001
Eritromicina		26 μ M	HEK	Rampe y Murawsky, 1997
Espironolactona		134 μ M	Ltk	Gómez y cols., 2005
Flecainida	2.9 μ M	101 μ M	MAP, MEL	Yue y cols., 2000; Grissmer y cols., 1994
Fluoxetina		21 μ M	CHO	Perchenet y cols., 2001
HMR1556	10 μ M (36%)	> 10 μ M	MVC	Gögelein y cols., 2000
Irbesartán		20 nM	Ltk	Moreno y cols., 2003
Ketoconazol		107 μ M	OX	Dumaine y cols., 1998
Loratadina		1.2 μ M	Ltk	Delpón y cols., 1997
Losartán		1 μ M (9%)	Ltk	Caballero y cols., 2000
Mibefradil		0.78 μ M	CHO	Perchenet y Clement-Choienne, 2000
Nifedipino	8.2 μ M	81 μ M	MAH, MEL	Gao y cols., 2005; Grissmer y cols., 1994
Papaverina	> 100 μ M	43 μ M	MVC, OX	Choe y cols., 2003
Pergolida		15.4 μ M	CHO	Jeong y cols., 2012b
Pimozida		10 mM (29%)	HEK	Kang y cols., 2000
Propafenona	8.6 μ M	4.4 μ M	MAH, Ltk	Franqueza y cols., 1998; Seki y cols., 1999
Quinidina	5 μ M	6.2 μ M	MAP, Ltk	Yue y cols., 2000
Riluzole		39 μ M	CHO	Ahn y cols., 2005
Ropivacaína		80 μ M	Ltk	Valenzuela y cols., 1997b
Rupatadina		2.4 μ M	Ltk	Caballero y cols., 1999
Sibutramina		39 μ M	CHO	Perchenet y cols., 2001
Simvastatina		5.7 μ M	Ltk	Vaquero y cols., 2007
Sertindol		2.1 μ M	HEK	Rampe y cols., 1998
D-Sotalol	> 500 μ M	> 1 mM	MAH, MEL	Feng y cols., 1997; Grissmer y cols., 1994
Verapamilo	2.2 μ M	5.1 μ M	MAP, OX	Yue y cols., 2000; Waldegger y cols., 1999

Tabla I.13. Fármacos que bloquean la corriente I_{Kur} y el canal Kv1.5 con sus correspondientes valores de CI_{50} . En aquellos fármacos que tengan un porcentaje entre paréntesis, éste se refiere al efecto producido a la concentración indicada. C: Cobayo. CHO: Células de ovario de Hamster Chino. H: humanos. HEK: Células embrionarias de riñón. Ltk: fibroblastos de ratón. MA: Miocitos auriculares. MEL: Células de eritroleucemia de ratón. MV: Miocitos ventriculares. OX: Oocitos *Xenopus*. P: Perro. [Modificada de Tamargo y cols., 2004b].

Varios fármacos antiarrítmicos (ambasilida, amiodarona, dronedarona, flecainida, quinidina, propafenona, tedisamil) (Snyders y cols. 1993; Wang y cols., 1995b; Yue y cols., 2000; Doggrell y cols., 2004; Tamargo y cols., 2004b), anestésicos locales (bupivacaína y benzocaína) (Valenzuela y cols., 1995; Franqueza y cols., 1997; Delpón y cols., 1999; Caballero y cols., 2002), antagonistas de receptores de angiotensina II (losartán, candesartán, irbesartán) (Caballero y cols., 2000; Moreno y cols., 2003; Delpón y cols., 2005), atorvastatina (Vaquero y cols., 2007), espironolactona (Delpón y cols., 2005; Gómez y cols., 2005), inhibidores de la corriente marcapasos [zatebradina (Valenzuela y cols., 1996) e ivabradina (Delpón y cols., 1996)] y algunos antagonistas del calcio (verapamil, diltiazem, nifedipino) (Yue y cols., 2000; Caballero y cols., 2004b; Zhang y cols., 1997) son capaces de inhibir la I_{Kur} además de sus efectos sobre otros canales iónicos. La Tabla I.13 resume diversos fármacos que inhiben la I_{Kur} y bloquean el canal Kv1.5 junto con sus valores de CI_{50} .

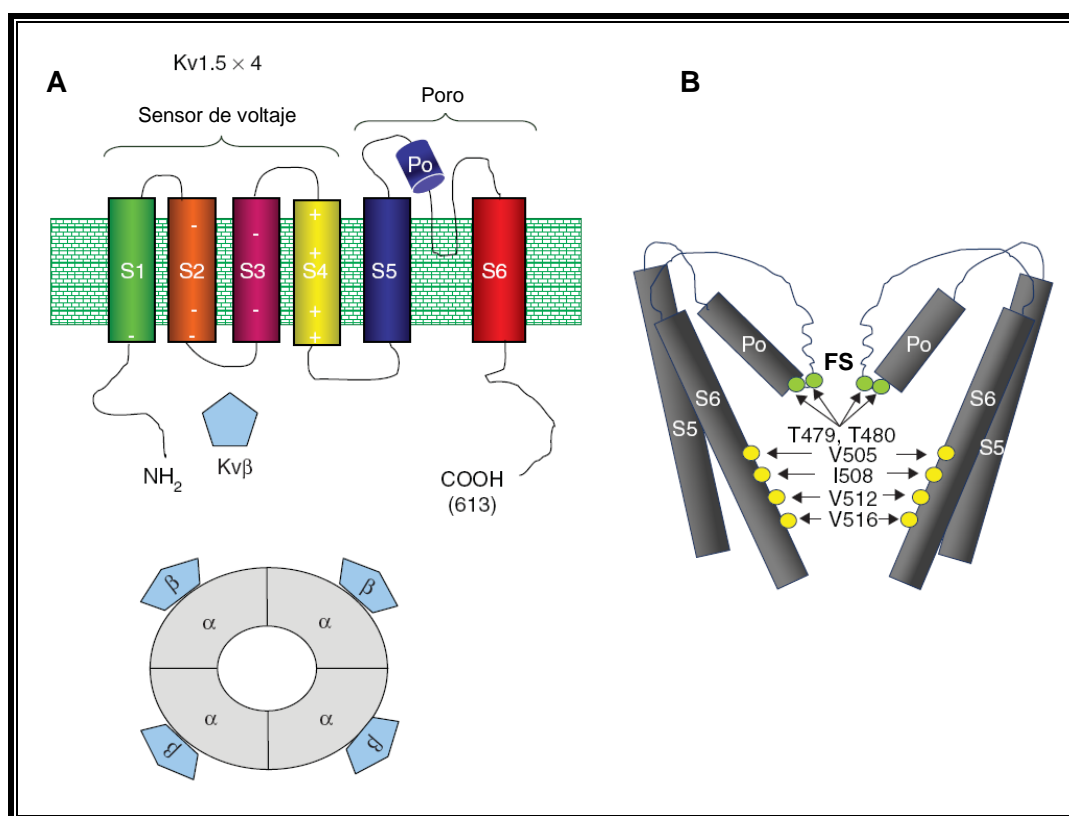


Figura I.27. Estructura molecular del canal Kv1.5. (A) Representación esquemática de la estructura de una subunidad α Kv1.5 y de la subunidad β citoplasmática. Cuatro subunidades α se ensamblan con cuatro subunidades β para formar el canal funcional. (B) FS: Filtro de selectividad. Po: Porción del lazo P que forma parte del poro. (Tamargo y cols., 2009).

En general, los inhibidores de la I_{Kur} parecen actuar interaccionando con los canales Kv1.5 en estado abierto (Tamargo y cols., 2004b). Esta teoría se apoya en tres hechos: a) producen una rápida caída de la corriente tras la despolarización y un retraso en la deactivación al

repolarizar la membrana, b) poseen poca afinidad por el estado cerrado o inactivo y c) el bloqueo de los canales aumenta al aumentar la frecuencia de estimulación.

Se ha identificado el poro iónico como el sitio de unión de los bloqueantes de los canales Kv1.5 (Figura I.27) (Tamargo y cols, 2009). De hecho mutaciones de residuos localizados en la base del poro cerca del filtro de selectividad (Thr479 y Thr480) y en el S6 (Thr507, Leu510 y Val514) modificaban la potencia con la que fármacos como la bupivacaína, benzocaína o quinidina bloqueaban estos canales (Yeola y cols., 1996; Franqueza y cols., 1997; Caballero y cols., 2002). Por lo tanto era predecible que esos últimos residuos estuvieran orientados hacia la cavidad del poro. Sin embargo un estudio demostró mediante modelado molecular que la Thr507, la Leu510 y la Val514, que también determinan el bloqueo producido por irbesartán, no están orientados hacia la cavidad central (Moreno y cols., 2003). Más recientemente, estudios de mutagénesis y de modelado molecular y docking han confirmado que esas dos treoninas localizadas en la base del poro y varios residuos del S6 orientados hacia la cavidad del poro (Val505, Ile508, Val512, Val516) son los sitios de unión de inhibidores como el AVE0118, S0100176 o el vernakalant (Decher y cols., 2004b; Decher y cols., 2006; Eldstrom y cols., 2007) (Figura I.27). Esos residuos se encuentran muy conservados entre los distintos canales de K^+ dependientes de voltaje, lo que explicaría la dificultad para desarrollar inhibidores selectivos de la I_{Kur} . Además hay un polimorfismo (P532L) situado cerca de esa región del canal, que aparece con una frecuencia de 1.1% en la población afroamericana (Drolet y cols., 2005; Simard y cols., 2005). En estos individuos la I_{Kur} generada es prácticamente idéntica a la nativa, sin embargo presenta una sensibilidad menor a fármacos antiarrítmicos como quinidina y propafenona (Simard y cols., 2005).

Por otro lado, también se ha demostrado que en la boca externa del canal formado por el lazo P y por las regiones adyacentes de los segmentos S5 y S6 se encuentran diversos sitios de unión para fármacos como el nifedipino (Zhang y cols., 1997) o para ácidos grasos poliinsaturados (Honoré y cols., 1994). El hecho de que la R(+)-N-metil-bupivacaína ejerza efectos distintos sobre la I_{Kur} según sea aplicada intra o extracelularmente, confirma la existencia de un sitio de unión extracelular para anestésicos locales parecidos a la bupivacaina (Longobardo y cols., 2000).

II.e. Papel de la I_{Kur} en la fibrilación auricular

El remodelado eléctrico inducido por la FAC afecta de forma profunda y diferenciada a las corrientes repolarizantes voltaje-dependientes en ambas aurículas (Van Wagoner y cols.,

1999; Nattel y cols., 2000; Gaborit y cols., 2005; Michael y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a; Schotten y cols., 2011; Wakili y cols., 2011; González de la Fuente y cols., 2013). La presencia de FAC produce una disminución del porcentaje de células con patrón I_{to1} predominante en ambas aurículas a la vez que produce un aumento del porcentaje de células con patrón intermedio en la AI y un aumento del porcentaje de células I_{Kur} predominante en la AD (Caballero y cols., 2010a).

Como se ha comentado anteriormente, en RS existe un gradiente de densidad de la I_{Kur} AD-AI (Figura I.28A). Sin embargo, en pacientes con FAC, ese gradiente desaparece puesto que la densidad de la I_{Kur} disminuye significativamente, siendo esa disminución más marcada en la AD que en la AI (Figura I.28) (Caballero y cols., 2010a). Se ha descrito que la disminución de la densidad de la corriente se debe a una disminución en la expresión de la proteína Kv1.5, sin afectar a los niveles de ARNm, debido a la proteólisis inducida por la FAC (Van Wagoner y cols., 1997). Nuestro grupo de trabajo obtuvo resultados similares, confirmando que la disminución de la I_{Kur} no estaba relacionada con cambios en los niveles de ARNm del canal Kv1.5 (Figura I.28) (Caballero y cols., 2010a).

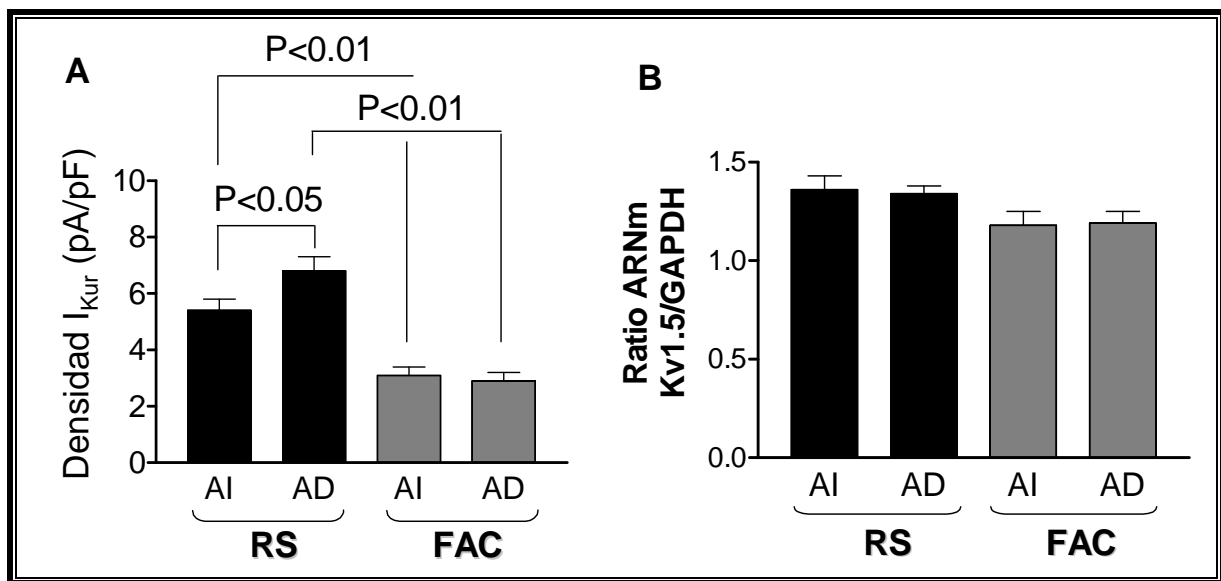


Figura I.28. Distribución auricular de la I_{Kur} . (A) Densidad de I_{Kur} registrada a +30 mV en miocitos procedentes de orejuela izquierda (AI) y derecha (AD) de pacientes en RS y con FAC. (B) Histograma del análisis densitométrico de la expresión del ARNm de Kv1.5, normalizada con respecto a la expresión del ARNm de la GAPDH, en muestras procedentes de orejuela izquierda (AI) y derecha (AD) de pacientes en RS y con FAC (Caballero y cols., 2010).

Por ser la I_{Kur} una corriente exclusivamente auricular, en los últimos años se ha propuesto que los fármacos que actúen como inhibidores selectivos de la I_{Kur} podrían ser útiles para el tratamiento de las arritmias auriculares y que además carecerían de efectos adversos a nivel ventricular (Brendel y Peukert, 2002; Nattel, 2002; Tamargo y cols., 2009). El bloqueo

selectivo de la I_{Kur} prolongaría la DPA auricular y el periodo refractario efectivo auricular (PREA) revirtiendo la FA a RS sin afectar a la repolarización ventricular (intervalo QTc), disminuyendo así el riesgo de arritmias ventriculares. De hecho, la inhibición selectiva de la I_{Kur} con 4-AP, prolonga la DPA en el tejido auricular humano (Wang y cols., 1993) y la refractariedad auricular pero no la ventricular en el perro (Nattel y Li, 2000). Además, Courtemanche y cols. describieron, usando un modelo matemático de PA auricular humano, que la inhibición de la I_{Kur} (90%) en condiciones fisiológicas normales (como las de RS) produciría un aumento en la activación de la $I_{Ca,L}$ desplazando la fase de meseta hacia potenciales más positivos. De este modo la I_{Kr} se activaría más rápido y por tanto la repolarización se aceleraría y la DPA medida al final de la repolarización y el PR no se verían afectados (Figura I.29A). Sin embargo, en los PA de tejido auricular remodelado por la FA, en los que la $I_{Ca,L}$ y la I_{to} están disminuidas, la inhibición de la I_{Kur} desplaza la fase de meseta hacia potenciales más positivos pero por debajo de 0 mV. Así, la activación de las corrientes repolarizantes sería menos pronunciada y por lo tanto se produciría una prolongación de la DPA medida en la fase final de la repolarización (Figura I.29B).

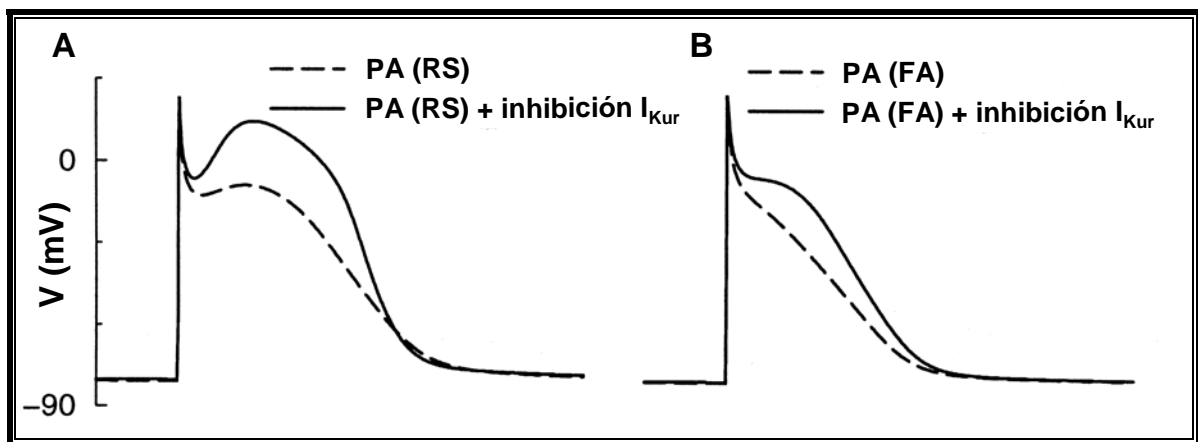


Figura I.29. Efecto de la inhibición de la I_{Kur} en un modelo matemático de PA auricular humano. (A) Morfología de un PA en situación control en RS (línea discontinua) y tras la inhibición de la I_{Kur} en un 90% (línea continua). (B) Morfología de un PA en FA (línea discontinua) y tras la inhibición de la I_{Kur} en un 90% (línea continua). [Adaptado de Courtemanche y cols., 1999].

A pesar de lo anteriormente expuesto, existe cierta controversia acerca de si la modulación exclusiva de la I_{Kur} sería realmente efectiva en el tratamiento de la FA. Esto se debe a que a) la I_{Kur} se inactiva a altas frecuencias como las que se producen durante la FA (Feng y cols., 1998a), b) la I_{Kur} está disminuida en esos pacientes (Caballero y cols., 2010a) y c) la inhibición de la I_{Kur} podría provocar pospotenciales tempranos en situaciones de estrés adrenérgico (Olson y cols., 2006). De hecho se han descrito cuatro mutaciones (E375X, T527M, A576V, E610K) en el gen KCNA5 que producen una pérdida de función del canal

Kv1.5 y que se han relacionado con la aparición de FA familiar (Olson y cols., 2006; Yang y cols., 2009). La hipótesis es que en estos pacientes la disminución marcada de la I_{Kur} prolonga la DPA auricular favoreciendo la aparición de extrasístoles inducidos por postpotenciales tempranos y tardíos que desencadenan los episodios de FA.

En la Tabla I.14 aparecen nuevos inhibidores de la I_{Kur} que están en fase de estudio. Datos de modelos experimentales y evidencias clínicas en pacientes con FA confirman que algunos de estos nuevos inhibidores prolongan la DPA y el PREA (izquierdo > derecho) y aumentan la contractilidad auricular a concentraciones a las que no tienen efectos ni sobre la conducción intracardíaca ni sobre la repolarización ventricular (Ford y cols., 2008). Estos fármacos inhiben la I_{Kur} de manera frecuencia-dependiente por lo que podrían ser más potentes prolongando el PREA en FA que en RS y más eficientes terminando la FA que manteniendo el RS (Matsuda y cols., 2001; Brendel y Peukert, 2002; Knobloch y cols., 2002; Blaauw y cols., 2004; Dorian y cols., 2007; Tamargo y cols., 2009). Sin embargo, muchos de los fármacos desarrollados como inhibidores selectivos de la I_{Kur} tienen efectos sobre otras corrientes cardíacas (Tabla I.14). Sólo S9947, ISQ-1, DPO-1 y XEN-D0103 se pueden considerar inhibidores selectivos, puesto que su efecto inhibitor sobre la I_{Kur} domina sobre sus efectos sobre otras corrientes que determinan la repolarización ventricular (Ford y cols., 2008; Tamargo y cols., 2009; Milnes y cols., 2012).

A pesar de que existen pocos datos clínicos sobre la seguridad y eficacia del resto de inhibidores selectivos de la I_{Kur} , estos fármacos representan el primer paso para desarrollar antiarrítmicos específicos a nivel auricular que carezcan de efectos a nivel ventricular.

Introducción

	I_{Kur}	Kv1.5	I_{to}	I_{Kr}	I_{Ks}	I_{K1}	I_{KAch}	I_{KATP}	I_{Na}	I_{CaL}	Especie	Ref
Acetina	3.2		9.3			NS	4		NS	NS	HEK293,MAH	Li y cols., 2008
AVE0118	1.1-1.3	1.1-6.2	1.8-3.4	10	10% (10 μ M)		4.5	10% (10 μ M)		22% (10 μ M)	CHO,OX,MAC,MVC,MAP	Gögelein y cols., 2004a
AVE1231	0.9-1.1	3.6	3.3-5.9	30	NS	NS	8.4	35% (30 μ M)	NS	26% (30 μ M)	CHO,MAC,MVC,MAP	Wirth y cols., 2007;
AVE3295	0.3	0.3	0.5	6% (10 μ M)			2.4				CHO,OX,MAP	Gögelein y cols., 2004a; Gögelein y cols., 2004b
AZD7009		27	24	0.6	193				4.3 (10Hz)		CHO	Persson y cols., 2005
C9356		4.4	34	97					335		HEK293	Fedida y cols., 2003
Comp-9		4.2		100			7.8		340		WO/2006/136305	
DPO-1	0.03-0.08	0.16	NS	3% (3 μ M)	24% (10 μ M)	15% (3 μ M)					CHO,OX,MAH	Lagrutta y cols., 2006
ICAGEN-4	1	0.16-1.6									Ltk, L929, OX	Strutz-Seeböhm y cols., 2007
ISQ-1		238 nM		>30 μ M				<20% (10 μ M)	<20% (10 μ M)	<20% (10 μ M)	CHO	Trotter y cols., 2006; Regan y cols., 2008
NIP-142	5.3	4.8	16.3	44		40% (10 μ M)	0.64		0	50% (10 μ M)	MAH,HEK293	Tanaka y cols., 2007
S9947	0.07	0.42	20% (10 μ M)	0% (10 μ M)		15% (10 μ M)					CHO,OX,MVR,MAH	Bachmann y cols., 2001; Strutz-Seeböhm y cols., 2007
Vernakalant	9/0.8 (1/3Hz)	13	30	21		>1mM	11		19 (1Hz)		MVC,HEK293	Beatch y cols., 2003; Fedida y cols., 2005; Strutz-Seeböhm y cols., 2007
XEN-0103	0.05	0.1		12					28	>200	MAH	Ford y cols., 2008 Milnes y cols., 2012

Tabla I.14. Nuevos inhibidores de la I_{Kur} . Los datos están expresados como valores de CI_{50} (μ M) En aquéllos que tengan un porcentaje, éste se refiere al efecto producido a la concentración indicada entre paréntesis. CHO: Células de ovario de Hamster Chino. HEK: Células embrionarias de riñón. Ltk y L929: Fibroblastos de ratón. C: Cobayo. H: humanos. P: porcinos. MA: Miocitos auriculares. MV: Miocitos ventriculares. OX: Oocitos *Xenopus*. [Modificada de Tamargo y cols., 2009].

III. La I_{Kr}

El componente rápido de la corriente de salida de K^+ con rectificación tardía contribuye a la fase 3 de la repolarización y juega un importante papel en el control de la DPA y del periodo refractario (Hancox y cols., 1998; Zhou y cols., 1998; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004b). La importancia de la I_{Kr} se ha puesto de manifiesto gracias a diferentes patologías en las que se producen mutaciones tanto en la subunidad α (Sanguinetti y cols., 1995 y 1996a) como en las subunidades β (Abbott y cols., 1999), que se pueden manifestar como SQTL o SQTC congénitos o adquiridos (Splawski y cols., 2000; Tamargo, 2000) y que se han relacionado con un aumento del riesgo de sufrir arritmias. Además, la I_{Kr} es la diana terapéutica de los antiarrítmicos de clase III (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Spector y cols., 1996a; Nattel y Singh, 1999).

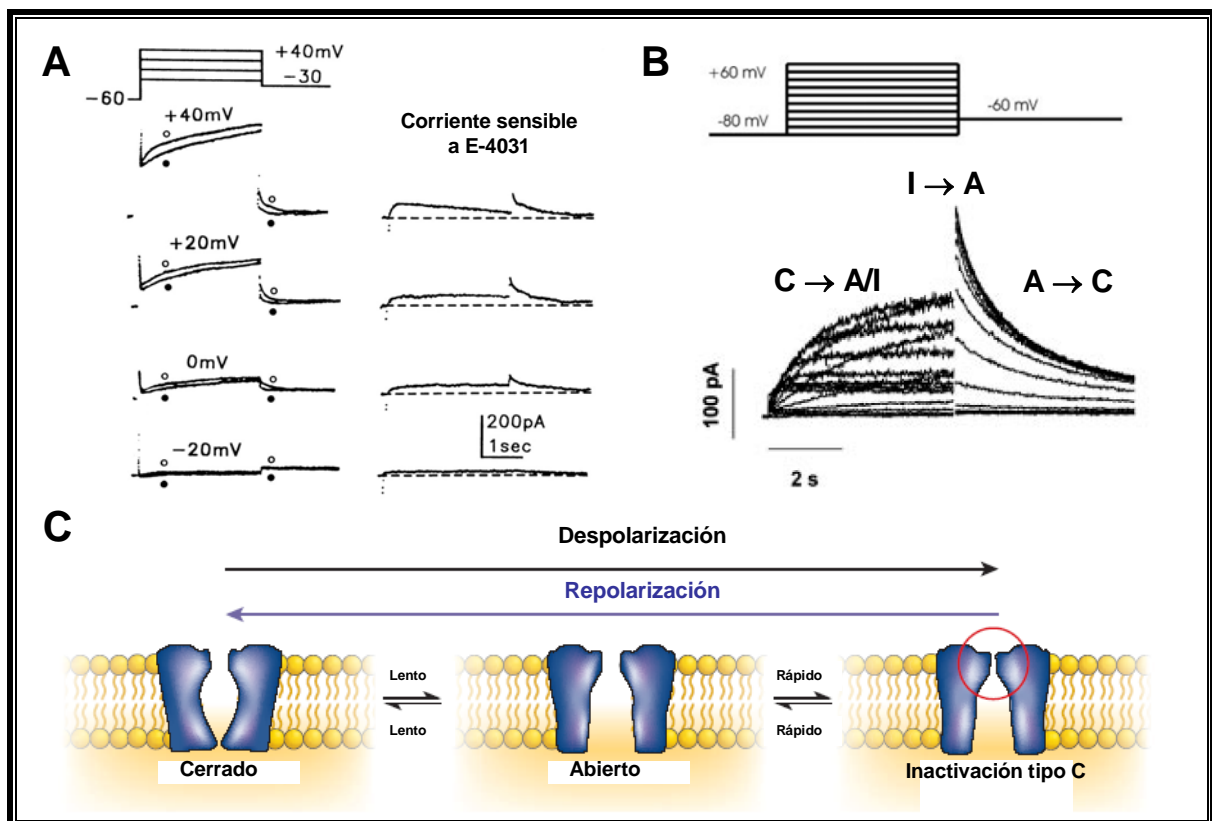


Figura 1.28. Características de la I_{Kr} . (A) Corriente registrada en miocitos ventriculares humanos en ausencia (○) y en presencia (●) de E-4031 tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior (a la izquierda) y componente sensible al E-4031 (la I_{Kr} , a la derecha). (B) Registro de la corriente generada por subunidades Kv11.1 registrada en nuestro laboratorio en células CHO tras la aplicación del protocolo que se muestra en la parte superior. Se muestran las transiciones entre las diferentes conformaciones del canal (A: Activo. C: Cerrado. I: Inactivo). (C) Representación esquemática de los distintos estados del canal Kv11.1. [Adaptadas de Li y cols., 1996a (A), Caballero y cols., 2003 (B) y Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006 (C)]

III.a. Características de la I_{Kr}

Con la despolarización del E_m , la amplitud de la I_{Kr} va aumentando progresivamente hasta alcanzar un máximo a potenciales entre 0 y +10 mV. A potenciales más positivos, la amplitud disminuye debido a que la inactivación del canal tiene lugar más rápidamente que la activación (Figura I.28) (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Li y cols., 1996a; Spector y cols., 1996b; Smith y cols., 1996; Hancox y cols., 1998; Tseng, 2001). Sin embargo, cuando la repolarización alcanza valores de E_m negativos (en la fase 3 del PA), los canales que generan la I_{Kr} se recuperan rápidamente de la inactivación y vuelven a entrar en el estado abierto (la velocidad de recuperación de la inactivación a través del estado abierto es más rápida que la de deactivación), lo que da lugar a una corriente de gran tamaño que facilita la repolarización final del PA (Figura I.28B) (Hancox y cols., 1998; Zhou y cols., 1998; Tseng, 2001). Por todo ello, el grado de activación de la I_{Kr} durante la fase 2 viene determinado por la dependencia de voltaje y de tiempo de la activación de los canales, mientras que en la fase 3 su participación está determinada por la recuperación de la inactivación y la deactivación de los mismos (Tseng, 2001). Tanto las características biofísicas como la distribución de los canales que generan la I_{Kr} son específicas de cada especie. Así, la densidad de la I_{Kr} en el miocardio humano es mayor en el ventrículo que en la aurícula, mientras que en la rata y el cobayo ocurre lo contrario (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1991; Pond y cols., 2000; Tseng, 2001; Tamargo y cols., 2004b).

III.b. Composición de los canales que generan la I_{Kr}

La subunidad α Kv11.1 (antiguamente denominada hERG, *human ether-à-go-go related gene*) es la responsable de la generación de la I_{Kr} (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990 y 1991). Además de en el miocardio, esta subunidad se expresa en sistema nervioso, músculo liso y células tumorales (Curran y cols., 1995; Tseng, 2001). La subunidad Kv11.1 presenta, al menos, dos isoformas debidas a modificaciones postranscripcionales en su extremo N-terminal (hERG1a y hERG1b) con diferentes propiedades biofísicas (London y cols., 1997; Wang y cols., 2000b), y se piensa que ambas isoformas se ensamblan en el miocardio para formar un canal heterotetramérico (Jones y cols., 2004). Sin embargo, la I_{Kr} nativa y la corriente generada por los canales Kv11.1 ($I_{Kv11.1}$) expresados en sistemas heterólogos se diferencian en el *gating* y la conductancia del canal, así como en la regulación por la $[K^+]_e$.

(Tseng, 2001; Tristani-Firouzi y Sanguinetti, 2003), sugiriendo la participación de subunidades auxiliares en la generación de esta corriente.

La utilización de AsODN contra el ARNm de minK producía una disminución en la amplitud de la I_{Kr} en células AT-1, una línea tumoral de miocitos auriculares, lo que sugería la implicación de esta subunidad auxiliar en la formación de los canales que generan esta corriente (Yang y cols., 1995). De hecho, la amplitud de la I_{Kr} era significativamente menor en los cardiomiocitos de ratones minK^{-/-} que en los de ratones control. Además, la posterior coexpresión de minK en dichos miocitos producía el aumento de la I_{Kr} (Kupershmidt y cols., 1999). La coexpresión de minK también aumentaba la amplitud de la $I_{Kv11.1}$ en células HEK293 (McDonald y cols., 1997).

Por otro lado, las subunidades Kv11.1 y MiRP1 son capaces de formar complejos estables *in vitro* (Abbott y cols., 1999; Cui y cols., 2000). MiRP1 se expresa en fibras de Purkinje y en células del nodo del seno, mientras que a nivel auricular y ventricular su expresión es muy baja (Lundquist y cols., 2005), por lo que se ha sugerido que sólo interacciona con las subunidades α Kv11.1 en el sistema de conducción (Weerapura y cols., 2002). La importancia de MiRP1 en la generación de la I_{Kr} se ha puesto de manifiesto tras la descripción de mutaciones en el gen que codifica esta proteína, ya que producen la disminución de la I_{Kr} y se relacionan con la aparición de SQT6 (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

III.c. La I_{Kr} en diversas patologías

En un modelo canino de infarto, la densidad de la I_{Kr} y los niveles de ARNm de Kv11.1 se encuentran reducidos en miocitos ventriculares (Jiang y cols., 2000). Sin embargo, 48 horas después del infarto, la densidad de la I_{Kr} aumenta en las células de Purkinje subendocárdicas, lo que ocasiona un aumento en la heterogeneidad de la repolarización ventricular. Esta heterogeneidad en la repolarización puede favorecer los efectos proarrítmicos de ciertos fármacos en pacientes con infarto de miocardio. Además, tanto la hiperglucemia como la hipoglucemia inhiben la corriente generada por canales Kv11.1 y pueden causar prolongación del QT y arritmias ventriculares, ya que el ATP proveniente de la glicolisis y de la fosforilación oxidativa es crítico para la función de estos canales (Zhang y cols., 2003).

III.d. Canalopatías asociadas a las subunidades Kv11.1 y MiRP1

Diferentes mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv11.1 y MiRP1 se han relacionado con la aparición de SQT1 y de SQT2.

Se conocen más de 200 mutaciones en el gen que codifica la subunidad Kv11.1 (KCNH2) asociadas al SQT1 (SQT1). El SQT1 representa un 30-35% de los casos de SQT1 y es el que mayor mortalidad presenta (Roberts, 2006). Todas las mutaciones identificadas producen una disminución de la I_{Kr} ocasionada por la pérdida/disminución en la función del canal Kv11.1 (Curran y cols., 1995; Zhou y cols., 1998b; Splawski y cols., 2000; Tseng, 2001; Rajamani y cols., 2002; Kass y Moss, 2003; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006, Sanguinetti, 2010; Amorós y cols., 2011). Una de ellas ha sido descrita recientemente por nuestro grupo. Se trataba de una mutación identificada en una familia española y asociada a SQT1 producida por la sustitución de un Glu por una Gly en la posición 637. Esta mutación abolía la rectificación interna mediante la supresión de la inactivación tipo C del canal Kv11.1 y eliminaba la selectividad por el K^+ . Estas alteraciones producían una marcada disminución de la amplitud de la corriente durante el PA lo que explicaba la prolongación del intervalo QT que se observaba en los pacientes que presentaban esta mutación (Amorós y cols., 2011). También se han descrito mutaciones en el gen que codifica la subunidad MiRP1 (KCNE2) asociadas a la aparición del SQT6 (Abbott y cols., 1999; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

La inhibición farmacológica de la I_{Kr} está relacionada con la aparición de un tipo de SQT1 que se denomina “SQT1 adquirido” (De Bruin y cols., 2005; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). Esta disminución de la I_{Kr} producida por fármacos está relacionada tanto con el bloqueo de los canales Kv11.1 que la generan (Mitcheson y cols., 2000) como con la inhibición del transporte a membrana de los mismos (Dennis y cols., 2007). En ambos casos, se produce un aumento de la DPA ventricular que prolonga el intervalo QT y el periodo refractario y favorece el desarrollo de pospotenciales tempranos (Sanguinetti y cols., 1996a; De Bruin y cols., 2005; Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006). Además, el aumento de la DPA que se produce es mayor en las células M que en el tejido subepicárdico y subendocárdico del ventrículo, lo que aumenta la dispersión de la repolarización ventricular (Haverkamp y cols., 2000; Tseng, 2001; Redfern y cols., 2003).

Por último, existen mutaciones en el gen KCNH2 relacionadas con la aparición del síndrome de QT corto tipo 1 (SQT1) (Brugada y cols., 2004). El SQT1 se caracteriza por un acortamiento del intervalo QT del ECG (<300 ms) y una marcada aceleración de la repolarización lo que predispone a padecer FA, FV y muerte súbita (Gussak y cols., 2000; Brugada y cols., 2004; Bjerregaard y Gussak, 2005). Hasta ahora se han descrito dos

mutaciones relacionadas con el SQTIC1, que consisten en la sustitución de un Asn por una Lys en posición 588 (Brugada y cols., 2004; Hong y cols., 2005) y en la sustitución de una Thr por una Ile en la posición 618 (Sun y cols., 2011). Ambas mutaciones producían un aumento de la I_{Kr} que se traducían en un acortamiento del intervalo QT (Brugada y cols., 2004; Schimpf y cols., 2005; Sun y cols., 2011).

IV. La I_{Ks}

El componente lento de la corriente de salida de K^+ con rectificación tardía participa fundamentalmente en la fase 3 de los PA auriculares y ventriculares (Jespersen y cols., 2005; Tamargo y cols., 2004b). La importancia de la I_{Ks} en la repolarización se pone de manifiesto porque las mutaciones en los genes que codifican los canales que generan esta corriente están relacionadas con la aparición de diversos síndromes arritmogénicos (SQTL1, SQTIC, FA y Jervell-Lange-Nielsen[SJLN]).

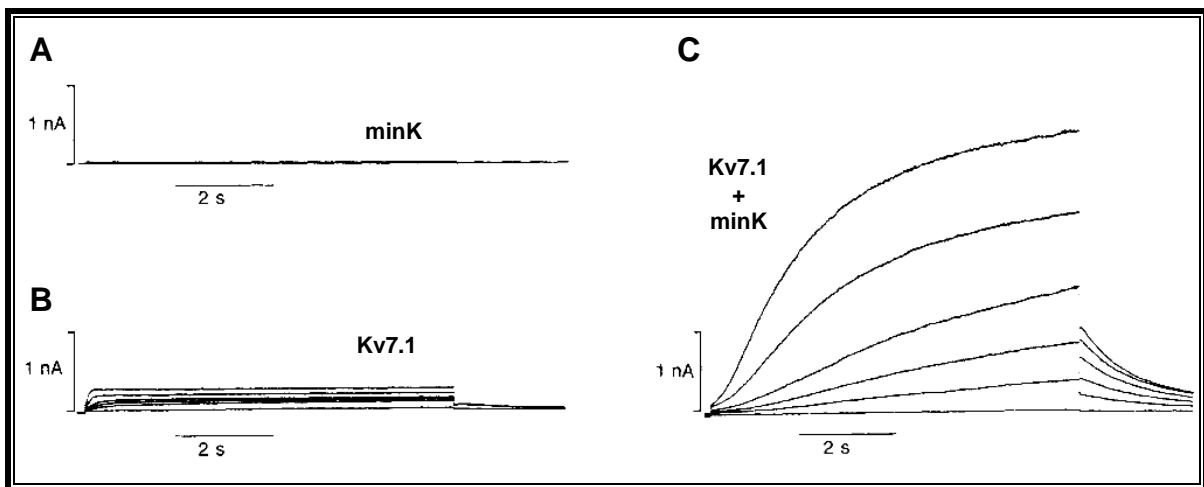


Figura 1.29. Características de la I_{Ks} . (A-C) Corrientes registradas en células de mamífero transfectadas sólo con las subunidades minK (A) y Kv7.1 (B) o con ambas subunidades a la vez (C). [Adaptadas de Sanguinetti y cols., 1996b]

IV.a. Características de la I_{Ks}

La I_{Ks} se activa a potenciales más positivos de -30 mV y alcanza la mitad de su activación máxima a +20 mV (Sanguinetti y Jurkiewicz, 1990; Kurokawa y cols., 2001). La cinética de activación de la I_{Ks} es muy lenta y su amplitud máxima en estado estable, que presenta una amplitud hasta 10 veces mayor que la de la I_{Kr} , sólo se alcanza con despolarizaciones extremadamente largas (Mitcheson y Sanguinetti, 1999), mientras que su cinética de deactivación es muy lenta y dependiente de voltaje (Virag y cols., 2001). La I_{Ks} es la principal

responsable del control de la DPA ventricular a frecuencias rápidas, ya que, al aumentar la frecuencia cardíaca, los canales que generan la I_{Ks} tienen menos tiempo para desactivarse y se acumulan en el estado abierto, propiciando una repolarización más rápida y el acortamiento de la DPA (Jurkiewicz y Sanguinetti, 1993; Delpón y cols., 1995; González de la Fuente y cols., 2013).

IV.b. Composición de los canales que generan la I_{Ks}

La subunidad α Kv7.1 (antiguamente denominada KvLQT1) se ensambla con la subunidad auxiliar minK para generar una corriente que se activa lentamente y cuyas características se corresponden con la I_{Ks} nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). La expresión en sistemas heterólogos de la subunidad α Kv7.1 genera una corriente ($I_{Kv7.1}$) que se activa rápidamente y se inactiva lentamente (Figura I.29B) y cuyas características son claramente diferentes a las de la I_{Ks} nativa (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b; Lee y cols., 1997). Por otro lado, la expresión de minK por sí sola no forma ningún canal funcional (Figura I.29A). Sin embargo, la coexpresión de ambas subunidades produce un incremento de la corriente generada, un retraso de la activación del canal y la desaparición de la inactivación, de manera que se obtiene una corriente con características muy similares a la I_{Ks} nativa (Figura I.29C) (Barhanin y cols., 1996; Sanguinetti y cols., 1996b). Además, la presencia de minK modifica la sensibilidad al pH intracelular y a la temperatura (Unsold y cols., 2000) y aumenta la conductancia de los canales Kv7.1 (Pusch, 1998), así como su afinidad tanto por los inhibidores (cromanol 293B, HMR-1556, XE991) como por los activadores (el ácido mefenámico y los ácidos láurico, oléico y docosahecanoico) de la I_{Ks} (Busch y cols., 1997; Unsold y cols., 2000; Wang y cols., 2000a). Actualmente se acepta que la I_{Ks} se genera a través de canales formados por 4 subunidades α Kv7.1 ensambladas con, al menos, 2 subunidades auxiliares minK (Chen y cols., 2003a) a través de un dominio en la región C-terminal de Kv7.1 (Ruscic y cols., 2013).

Hasta el momento se han identificado en el corazón 6 isoformas diferentes de Kv7.1 debidas a modificaciones postranscripcionales, siendo las isoformas 1 y 2 las de mayor expresión (Lee y cols., 1997; Pereon y cols., 2000). Además, se ha descrito que la subunidad Kv7.1 puede asociarse *in vitro* con los otros 4 miembros de la familia de proteínas codificadas por los genes KCNE (MiRP1 a MiRP4) (McCrossan y Abbott, 2004; Bendahhou y cols., 2005).

IV.c. Canalopatías y patologías asociadas a las subunidades Kv7.1 y minK

Diferentes mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv7.1 y minK se han relacionado con la aparición de SQTl, SQTc y FA familiar.

Los SQTl asociados a la I_{Ks} se deben a mutaciones en los genes que codifican las subunidades Kv7.1 y minK (SQTl1 y SQTl5, respectivamente) y se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales resultantes (Chouabe y cols., 1997; Schulze-Bahr y cols., 1997; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003). De todas ellas, las mutaciones en la subunidad Kv7.1 son responsables de alrededor del 50% de los casos de SQTl (Roberts, 2006). Además, se ha descrito una mutación en el gen que codifica la proteína yotiao que también cursa con prolongación del intervalo QT (SQTl11) (Chen y cols., 2007). La proteína yotiao es una proteína de anclaje para la PKA (AKAP, *A-Kinase Anchoring Protein*) que se ensambla con la subunidad α Kv7.1 y que permite la regulación β -adrenérgica de la I_{Ks} (Marx y cols., 2002).

Existen además otras mutaciones en los genes KCNQ1 y KCNE1 relacionadas con la aparición del Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen (SJLN, variante autosómica recesiva del SQTl asociada a sordera congénita) que se caracterizan por una pérdida/disminución en la función de los canales que se forman (Chouabe y cols., 1997; Splawski y cols., 2000; Kass y Moss, 2003).

Por otra parte, se ha descrito una mutación en la subunidad α Kv7.1 (V307L) que produce una ganancia de función del canal que está relacionada con la aparición de SQTc (SQTc2) (Bellocq y cols., 2004) y también otras mutaciones en dicha subunidad (Chen y cols., 2003b) y MiRP1 (Yang y cols., 2004) que se caracterizan también por producir una ganancia de función de los canales que generan y que se han asociado con la aparición de FA familiar.

Nuestro grupo ha descrito por primera vez que la FAC produce un aumento tanto de la amplitud como de la densidad de la I_{Ks} en ambas aurículas (Figura I.30A, Caballero y cols., 2010a). Esta corriente se acumula a frecuencias elevadas debido a su lenta cinética de desactivación, es decir, cuanto más rápida sea la frecuencia cardíaca, mayor será la salida de potasio, y por tanto, más corta la DPA (González de la Fuente y cols., 2013), favoreciendo el mantenimiento de la conducción fibrilatoria (Muñoz y cols., 2007a).

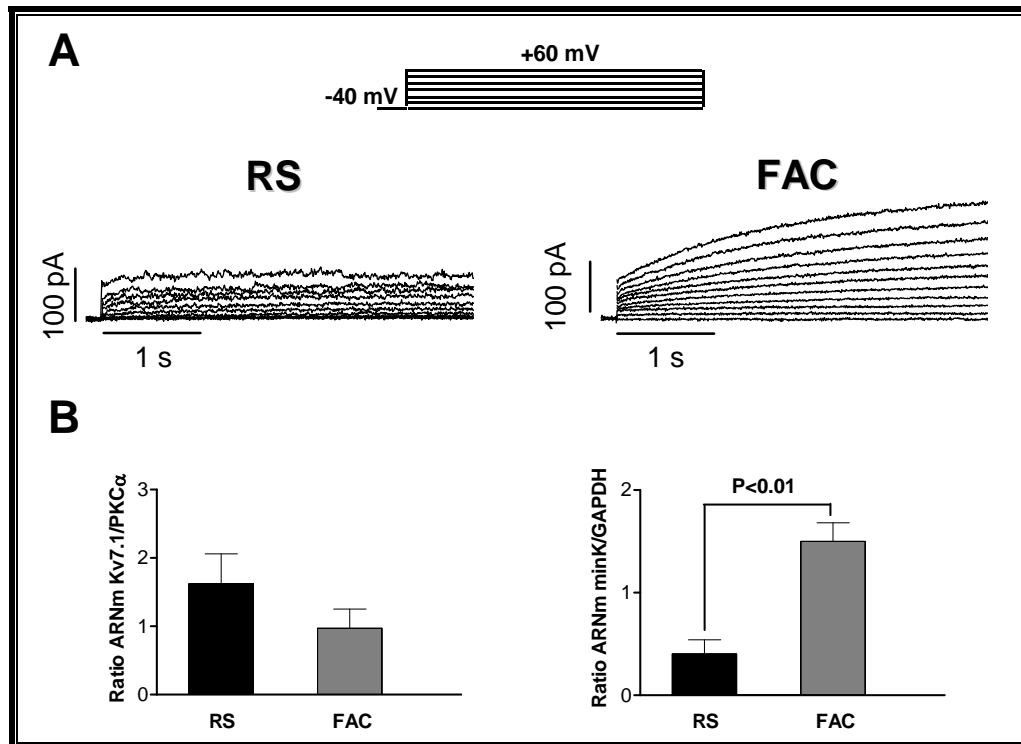


Figura I.30. I_{Ks} en FAC. (A) Familias de trazos de I_{Ks} registradas en un miocito procedente de un paciente en RS (panel izquierdo) y de un paciente con FAC (panel derecho). (B) Histograma del análisis densitométrico de la expresión del ARNm de Kv7.1 (panel izquierdo) y minK (panel derecho) en muestras procedentes de orejuela auricular de pacientes en RS y con FAC (Caballero y cols., 2010a).

Se habían descrito diferentes resultados (tanto aumentos como disminuciones) en cuanto a la expresión de Kv7.1 y de minK en FAC (Bosch y cols., 1999; Lai y cols., 1999a; Gaborit y cols., 2005; Michael y cols., 2009). Nuestros resultados coinciden con aquellos que demostraban que en presencia de FAC se produce una ligera disminución de la expresión del ARNm de Kv7.1 y un aumento significativo de la expresión de minK (Figura I.30B, Caballero y cols., 2010a).

3. FIBRILACIÓN AURICULAR

La FA es una taquiarritmia supraventricular caracterizada por una activación auricular descoordinada y la presencia en el ECG de una actividad auricular rápida (>350 latidos/min) de amplitud variable, que conduce a un deterioro de la función mecánica y a una respuesta ventricular irregular (Chugh y cols., 2001; Peters y cols., 2002; Nattel, 2002; Maisel y Stevenson, 2003; Anderson y cols., 2013).

La FA, tal como establece la *European Society of Cardiology* (ESC), se clasifica en: a) FA de primer diagnóstico, cuando el paciente presenta FA por primera vez, sin tener en cuenta la duración de la arritmia ni la persistencia y severidad de los síntomas; b) FA paroxística,

caracterizada por la aparición de episodios que duran menos de 7 días, con carácter autolimitante y que no requiere medicación; c) FA persistente, en la que la arritmia suele durar más de una semana y puede requerir cardioversión farmacológica o eléctrica para restaurar el RS, y d) FA permanente o crónica (> 6 meses), que no responde a cardioversión (Camm y cols., 2010, 2012).

En la actualidad, la FA representa un importante problema sanitario por varios motivos:

- a) Es la arritmia cardíaca de mayor prevalencia en la población general y la que más hospitalizaciones y gastos sanitarios origina (Benjamin y cols., 1998; Chugh y cols., 2001; Fuster y cols. 2011). En España, según datos del estudio OFRECE realizado por la Sociedad Española de Cardiología, el 4,4% de la población mayor de 40 años padece esta enfermedad, lo que representa más de un millón de personas (Gómez-Doblas y cols., 2013). Más aún, su prevalencia aumenta con la edad. Se calcula que más de 8 millones de europeos padecen esta arritmia y debido al progresivo envejecimiento de la población, se estima que su prevalencia se duplique en los próximos 50 años (Miyasaka y cols., 2006; Heeringa y cols., 2006; Camm y cols., 2010, 2012; Lip y cols., 2012; Krijthe y cols., 2013). La FA se diagnostica en un 15-35% de los pacientes con insuficiencia cardíaca (Maisel y Stevenson, 2003) y entre un 14.5% (<65 años) y un 33% (>75 años) de los sometidos a hemodiálisis (Vázquez y cols., 2000). Además es la complicación postoperatoria más común tras cirugía cardíaca, llegando a diagnosticarse en un 30% de los pacientes sometidos a bypass coronario y en un 40% de las operaciones de válvula cardíaca (Crystal y cols., 2004).
- b) La FA duplica la mortalidad del paciente independientemente de otros factores de riesgo diagnosticados (Stewart y cols., 2002).
- c) La FA desorganiza completamente la contractilidad auricular provocando la aparición de zonas de flujo turbulento y otras donde se produce remansamiento sanguíneo, favoreciendo la aparición de trombos intra-auriculares hasta en un 26% de los pacientes, lo que explica, parcialmente, el aumento de la incidencia de eventos tromboembólicos e ictus producido por la FA (5.3% vs. 0.8% en pacientes tratados con antiagregantes y anticoagulantes) (Atrial Fibrillation Investigators, 1994; Stoddard y cols., 1995; Wolf y cols., 1996).

3.1. Génesis de la FA

A pesar del esfuerzo dedicado al estudio de la FA, no se ha identificado un factor único que pueda considerarse *per se* la causa de la génesis y del mantenimiento de la FA. Los datos disponibles hasta el momento, sugieren que la patogénesis de la FA es multifactorial. Se

puede deber bien a la aparición de un foco ectópico con actividad eléctrica automática (localizado generalmente en las venas pulmonares) que produce frentes de onda a elevadas frecuencias que se conducen al resto de la aurícula de forma fibrilatoria, o bien, a la invasión de las aurículas por múltiples fuentes de reentrada de forma simultánea y desorganizada (reentrada por múltiples ondas). Ambos mecanismos no son excluyentes entre sí y de hecho es probable que puedan coexistir siendo los causantes de la aparición y del mantenimiento de la FA (Nattel, 2002; Fuster y cols., 2006; Kourliouros y cols., 2009).

Estos dos mecanismos electrofisiológicos consisten en:

A) Reentrada por múltiples ondas. En esta hipótesis, todo el miocardio auricular participa en el mantenimiento de frentes simultáneos de activación que continuamente giran, se dividen, se fusionan o se extinguen. Este mecanismo de reentrada implica el fraccionamiento de los frentes de onda que se propagarían por las aurículas y se autoperpetuarían como “ondas hijas” (Moe y Abildskov, 1959, Moe y cols., 1964). Aunque esta hipótesis se postuló en los años 60, el soporte experimental de esta teoría no llegó hasta los años 80, gracias a los experimentos de Allesie y colaboradores que demostraron que eran necesarios entre 4 y 6 frentes de onda para que la FA se pueda mantener (Allesie y cols., 1985). Según este modelo, el número de ondas presentes para el mantenimiento de la FA depende del periodo refractario, de la masa de la aurícula y de la velocidad de conducción en diferentes partes de la misma (Rensma y cols., 1988). Es decir, todo el miocardio auricular participa en el mantenimiento de frentes simultáneos que invaden las aurículas de forma caótica sin seguir un patrón. Además, los registros simultáneos mediante múltiples electrodos apoyaron la hipótesis de los múltiples frentes de onda en pacientes con FA (Cox y cols., 1991). Sin embargo, estudios cartográficos experimentales y clínicos pusieron en duda este mecanismo como única causa de FA (Mandapati y cols., 2000; Sanders y cols., 2005).

B) Origen focal de la FA. El origen focal de la FA estaba basado en modelos experimentales en los que se demostraba que la arritmia persiste en regiones aisladas en el miocardio auricular. Ya a principios del siglo XX, Winterberg y cols. postularon que la FA se producía por un foco ectópico cuya actividad se conducía al resto de la aurícula (Winterberg, 1907). Cincuenta años después, Scherf recuperó la teoría de la existencia de un foco automático para explicar la génesis de la FA (Scherf, 1958). Sin embargo, en los años 60 la teoría dominante era la de la reentrada por múltiples ondas y, por ello, no se prestó más atención a la teoría focal hasta los trabajos del Dr. Haïssaguerre. En estos trabajos se describían casos de FA paroxística debidos a descargas focales repetitivas desde las venas pulmonares, que podían ser suprimidas mediante la ablación del foco de origen (Haïssaguerre

y cols., 1998). Estudios cartográficos de la FA en corazones de oveja apuntaban a un generador primario local, que consistía en un pequeño circuito de reentrada, o bien un foco activo ectópico (Morillo et cols., 1995; Mansour et cols., 2001). El foco de la FA se puede deber a la actividad automática que presentan algunas células musculares auriculares presentes en las venas pulmonares, especialmente en su porción más distal, tal y como habían demostrado Cheung (1981) en estudios electrofisiológicos en cobayos y Chen en perros anestesiados (Chen y cols., 2000). Aunque se sabe que las venas pulmonares son la fuente más frecuente de impulsos auriculares rápidos, también éstos se pueden generar en otras localizaciones como la vena cava superior, el ligamento de Marshall, la pared libre posterior izquierda, la cresta terminal y el seno coronario (Haïssaguirre y cols., 1998; Chen y cols., 1999).

Otra teoría sobre el origen focal de la FA a nivel de las venas pulmonares, consiste en la existencia de un único, o un pequeño número, de circuitos de microreentrada o “rotores”. Winfree definió como *rotor* a la rotación estable de reacción y difusión que rodea a un pivote (Winfree, 1978). Estos pivotes o singularidades de fase se crean tras la rotura de un frente de onda al encontrarse en su propagación con tejido refractario o con un obstáculo anatómico. En ese punto de ruptura, el frente de propagación se curva y enlentece hasta llegar a converger con su propia cola de refractariedad, creándose un rotor de activación. Estos rotores se mantienen por sí mismos pero requieren estar anclados anatómicamente en un tejido muscular cardíaco heterogéneo (Samie y cols., 2001; Jalife y cols., 2002). Hocini y cols., concluyeron que el tejido miocárdico de las venas pulmonares se caracteriza por una anisotropía mucho mayor que la del resto del miocardio condicionada por la compleja disposición de los haces de fibras miocárdicos que cambian de dirección en muchos puntos. Esta característica determina las grandes diferencias en la velocidad de conducción del impulso en las porciones de epicardio y endocardio que rodean las venas pulmonares. Además, en el tejido conviven PAs extraordinariamente breves con otros normales y prolongados. La marcada anisotropía y la heterogeneidad en la repolarización (Hocini y cols., 2002) son el sustrato perfecto para que cualquier extrasístole (generada en las células automáticas de la zona) desencadene un rotor. Aunque no universalmente aceptada, la teoría de los rotores se ha convertido en una importante explicación mecanística de la FA (Voigt y cols., 2010; Skanes, 2009; Jalife, 2011; Narayan y cols., 2012).

El análisis de la dinámica de los rotores ha demostrado que el aumento de la I_{K1} acelera y estabiliza los rotores en modelos de FAC, mientras que el bloqueo individual de la I_{Kur} y de la

I_{to} , pero no de la I_{Kr} ni de la I_{Ks} , produce la terminación de los rotores debido a la prolongación en la fase de meseta en lugar de la fase terminal del PA (Pandit y cols., 2005).

Afortunadamente, es posible identificar las regiones de actividad periódica mediante análisis espectral de alta resolución. En la mayoría de los casos experimentales, la pared posterior de la AI es la que alberga las fuentes con la actividad espacio-temporal organizada más rápida (Mandapati y cols., 2000; Kalifa y cols., 2006). Los frentes de onda generados por estas fuentes toman patrones de conducción espacialmente complejos a medida que se acercan a la AD, y en conjunto, se manifiestan como un patrón de conducción fibrilatoria (Berenfeld y cols., 2002). La evidencia experimental de que la mayoría de las fuentes de FA se localizan en la AI procede de los estudios realizados en pacientes que demuestran que el aislamiento quirúrgico de la vena pulmonar es una estrategia efectiva para parar la FA paroxística (Medi y cols., 2011).

3.2. Causas y condiciones asociadas a la FA

En los últimos años se han demostrado diversas causas y condiciones asociadas a la FA:

- Causas reversibles. La FA puede ser un proceso agudo asociado a la ingesta de alcohol, cirugía cardíaca/coronaria, infarto de miocardio, pericarditis, miocarditis, embolismo pulmonar y otras enfermedades pulmonares, hipertiroidismo y otros desórdenes metabólicos. Por lo general, en estos casos, el tratamiento de la causa termina con el episodio de FA (Fuster y cols., 2006; Camm y cols., 2010 y 2012).
- FA sin enfermedad cardíaca asociada (idiopática). El 30-45% de los casos de FA paroxística y el 20-25% de los casos de FA permanente se produce en pacientes jóvenes sin ninguna enfermedad cardiovascular previa (Levy y cols., 1999). Por otra parte, la edad aumenta el riesgo de desarrollar FA, posiblemente debido a un progresivo incremento de la fibrosis del tejido miocárdico y a trastornos en la conducción derivados del mismo (Camm y cols., 2010 y 2012).
- FA asociada a enfermedad cardíaca. Las enfermedades cardíacas más comunes que se asocian a la FA son las valvulopatías, la insuficiencia cardíaca, la cardiopatía isquémica y la HTA en particular cuando hay hipertrofia del ventrículo izquierdo. Además, la FA también puede estar asociada a miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía dilatada y cardiopatías congénitas (Fuster y cols., 2006; Camm y cols., 2010 y 2012).
- La obesidad. Es un importante factor de riesgo independiente para desarrollar FA, ya que en los pacientes obesos se produce una dilatación de la AI, lo que crea un sustrato

idóneo para el mantenimiento de la arritmia (Frost y cols., 2005). En el estudio *Europace*, un 25% de los sujetos con FA, tenían un IMC >27.5 (indicador de obesidad moderada) (Nabauer y cols., 2009).

- FA familiar o genética. La FA familiar es más frecuente de lo que se había pensado previamente, pero debe diferenciarse de la FA secundaria a otras cardiomiopatías familiares. Hasta el momento, se han descrito formas de FA asociadas a mutaciones en el gen que codifica el péptido natriurético auricular (Hodgson-Zingman y cols., 2008), mutaciones de pérdida de función en el gen que codifica la subunidad α del canal de sodio (SCN5A) (Amin y cols., 2010) o de los canales Kv1.5 (KCNA5) (Olson y cols., 2006) o mutaciones de ganancia de función en los genes que codifican la subunidad α del canal de potasio Kv7.1 (KCNQ1) o de los canales Kir2.1 (KCNJ2) o en el gen que codifica para la subunidad accesoria MiRP1 (KCNE2), (Chen y cols., 2003b; Yang y cols., 2004; Xia y cols., 2005).
- Influencia del sistema nervioso autónomo. Un desequilibrio entre las influencias simpáticas y vagales es un importante predictor de FA. Descargas simultáneas simpático-vagales contribuyen al desarrollo y mantenimiento de arritmias auriculares ya que aumentan tanto la entrada de calcio como su liberación espontánea desde el retículo sarcoplásmico y acortan la DPA. Esto no sólo puede desencadenar la FA paroxística, sino que también puede facilitar el desarrollo de FA persistente (Shen y cols., 2011). Por lo general, la FA por mediación vagal se presenta por la noche o después de las comidas, mientras que la FA de tipo adrenérgico ocurre típicamente durante el día (Maisel, 2003). Nuevas estrategias que incluyen la ablación y la estimulación neural pueden reducir la actividad nerviosa arritmogénica, pero es necesario un mayor conocimiento de las mismas para poder ser aplicadas a nivel clínico (Shen y cols., 2011).

3.3. Remodelado en la FA

Se ha demostrado que la propia FA, *per se*, altera tanto las propiedades electrofisiológicas como la histología y anatomía de la aurícula de modo que promueve su propio mantenimiento y recurrencia. Así pues, se puede decir que la FA promueve la FA (*AF begets AF*) ya que hace que la aurícula se convierta en el sustrato idóneo para la perpetuación de la arritmia. (Wijffels y cols., 1995; Nattel y cols., 2000; Workman y cols., 2001; Krogh-Madsen y cols., 2012). Esta adaptación fisiopatológica de las aurículas al ritmo fibrilatorio se denomina *remodelado*

auricular. Más específicamente, los cambios que afectan a la excitabilidad y la actividad eléctrica de los miocitos auriculares se denomina *remodelado eléctrico* mientras que los cambios en el tamaño (dilatación) y en la estructura de la cámara (hipertrofia, fibrosis), se denominan *remodelado estructural* (Van Wagoner y Nerbonne, 2000).

3.3.1. Remodelado eléctrico

El remodelado eléctrico consiste, fundamentalmente, en el acortamiento de la DPA y del periodo refractario auricular a todas las frecuencias de estimulación, lo que permite que un mayor número de frentes de onda de excitación convivan simultánea y desordenadamente en la aurícula (Figura I.31) (Wijffels y cols., 1995; Nattel y cols., 2000; Allessie y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004a; Dobrev, 2006; Schotten y cols., 2011; Wakili y cols., 2011, González de la Fuente y cols., 2013).

La aparición del remodelado eléctrico es un proceso rápido y progresivo. En un modelo en el que se sometía a los perros a estimulación auricular rápida, ya se observaba la disminución del periodo refractario a los 30 minutos del inicio de la estimulación (Goette y cols., 1996). En condiciones fisiológicas la DPA, de la cual depende el periodo refractario auricular, disminuye a medida que aumenta la frecuencia cardíaca. Esta adaptación de la DPA a la frecuencia es un mecanismo de protección frente al desarrollo de arritmias y desaparece en el proceso de remodelado eléctrico (Wijffels y cols., 1995). Finalmente, tras varias semanas de FA, se produce una disminución de la velocidad de conducción intra-auricular, que contribuye al remodelado eléctrico y a la perpetuación de la arritmia (Nattel y cols., 2000; Allessie y cols., 2001; Tamargo y cols., 2004a).

El acortamiento de la DPA y la pérdida de la adaptación a la frecuencia son detectables tanto en tejido auricular como en miocitos auriculares de pacientes con FAC (Figura I.31) (Boutjdir y cols., 1986; González de la Fuente y cols., 2013). Este acortamiento es debido a cambios en la expresión y en las propiedades de los canales iónicos responsables de las corrientes que generan el PA auricular (Van Wagoner y cols., 1999; Nattel y cols., 2000; Gaborit y cols., 2005; Michael y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a; Schotten y cols., 2011; Wakili y cols., 2011; González de la Fuente y cols., 2013). De hecho, se ha descrito que el remodelado eléctrico puede ocurrir tanto a nivel de la expresión de los canales iónicos como por la alteración de las propiedades de los mismos (Kumagai y cols., 1991; Van Wagoner y cols., 1999; Nattel y cols., 2000; Van der Velden y cols., 2000; Goette y Lendeckel, 2004; Gaborit y cols., 2005; Caballero y cols., 2010a). Así, la amplitud de la principal corriente de

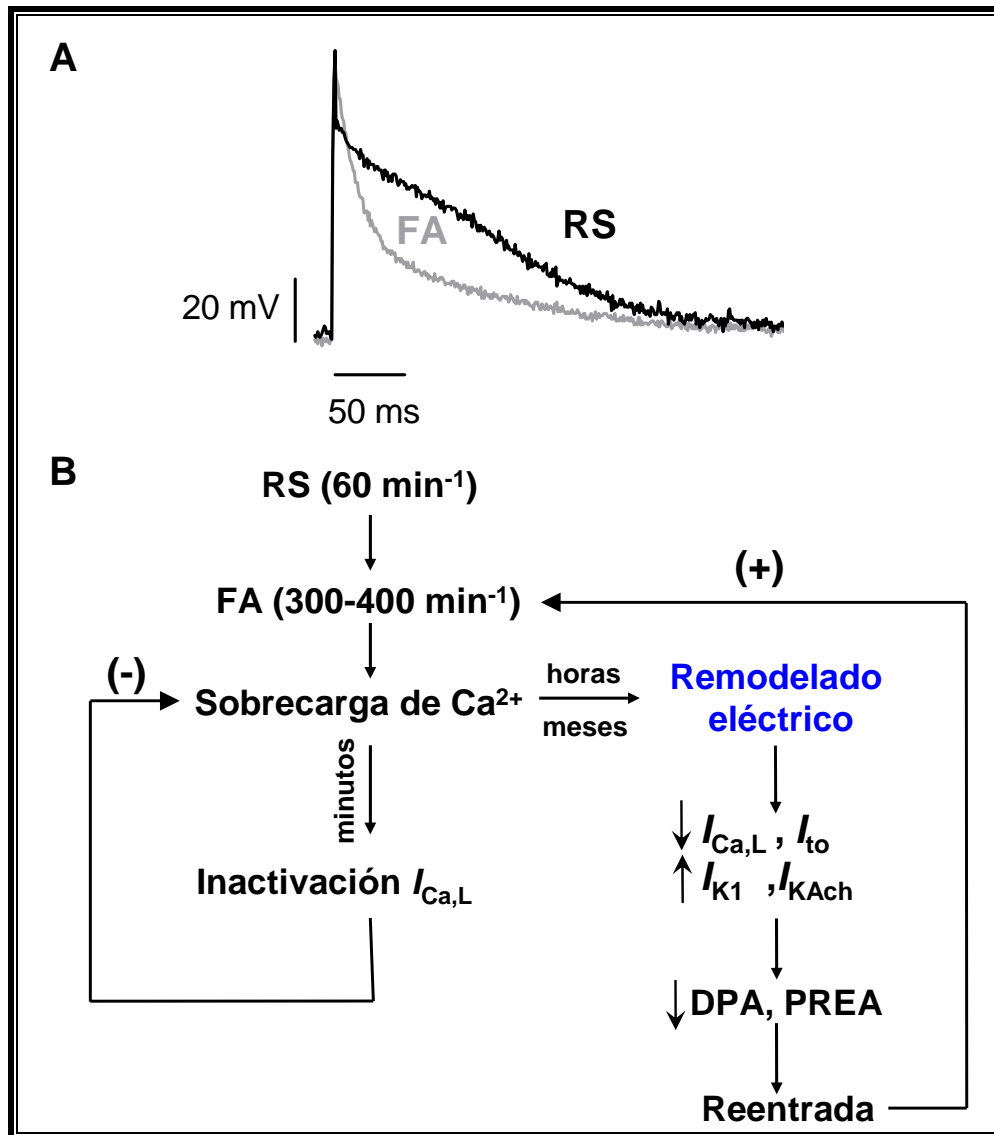


Figura I.31. Remodelado eléctrico en la FA. (A) PAs registrados en nuestro laboratorio en miocitos auriculares procedentes de un paciente en RS (negro) y de un paciente con FA crónica (gris). (B) Hipótesis de la sobrecarga de Ca^{2+} . Los miocitos se adaptan a la taquicardia auricular disminuyendo la carga de Ca^{2+} mediante la reducción de la $I_{\text{Ca,L}}$ y la posterior modificación de las corrientes de potasio pero a expensas del acortamiento de la duración del potencial de acción (DPA). PREA: Periodo refractario efectivo auricular. [Adaptada de Dobrev, 2006].

entrada de la fase de meseta, la $I_{\text{Ca,L}}$, se reduce un 70% en pacientes con FA (Van Wagoner y cols., 1999; Bosch y cols., 1999; González de la Fuente y cols., 2013) como consecuencia de una disminución en la expresión del ARNm y de la proteína Cav1.2 que forma el canal (Brundel y cols., 1999 y 2001; Gaborit y cols., 2005). La disminución en la $I_{\text{Ca,L}}$ es un mecanismo compensatorio para evitar la sobrecarga en la concentración de Ca^{2+} que se produce por la elevada frecuencia cardiaca propia de la FA y ocurre de forma inmediata (Figura I.31). Se ha descrito que este aumento en la concentración de Ca^{2+} además activa y aumenta la expresión de la calpaína, enzima proteolítica que probablemente sea la responsable de la disminución de los niveles de los canales de Ca^{2+} tipo L (Brundel y cols., 2002). En cuanto a la I_{Na} , se ha descrito que permanece inalterada (Bosch y cols., 1999) y que la

expresión de la subunidad α de los canales de Na^+ no se ve modificada por la presencia de FA (Brundel y cols., 2001), por tanto se cree que las alteraciones en la I_{Na} no contribuyen al remodelado eléctrico que produce la FA.

En lo que respecta a las corrientes de K^+ voltaje-dependientes, la FA produce una marcada disminución de la I_{to} , atribuida a una disminución en el nivel de ARNm y en la expresión de la proteína Kv4.3 (Van Wagoner y cols., 1999; Bosch y cols., 1999; Brundel y cols., 2001; Workman y cols., 2001; Michael y cols., 2009; Caballero y cols., 2010a). En cuanto a la I_{Kur} , se ha descrito que, aunque los niveles de ARNm de Kv1.5 no se modifican, la cantidad de proteína se reduce en pacientes con FAC debido a un proceso proteolítico, lo que explica que la I_{Kur} también se vea disminuida (Van Wagoner y cols., 1999; Bosch y cols., 1999; Brundel y cols., 2001; Caballero y cols., 2010a). Esta reducción de la I_{Kur} y de la I_{to} no era predecible ya que la reducción de estas corrientes prolonga la DPA y el periodo refractario y, sin embargo, en la FA lo que se observa es un acortamiento muy marcado de la DPA (Figura I.31A). Por ello, se ha propuesto que la disminución de estas corrientes podría ser un mecanismo de defensa celular en un intento de contrarrestar el acortamiento de la DPA provocado por la disminución de la $I_{\text{Ca,L}}$.

La FAC no modifica la I_{Kr} auricular (Bosch y cols., 1999; Caballero y cols., 2010a). En cuanto a la I_{Ks} , nuestro grupo ha descrito recientemente y por primera vez, cómo la FAC produce un marcado aumento de esta corriente (Caballero y cols., 2010a). La I_{Ks} se acumula a frecuencias elevadas debido a su lenta cinética de deactivación, es decir, cuanto más rápida sea la frecuencia cardiaca, mayor será la salida de K^+ , y por tanto, más corta la DPA, favoreciendo el mantenimiento de la conducción fibrilatoria (Muñoz y cols., 2007a). El aumento de la I_{Ks} parece ser debido a un aumento de la expresión de la subunidad minK (Caballero y cols., 2010a).

Se ha demostrado que la FAC produce alteraciones en las corrientes de K^+ con rectificación interna. La I_{K1} se encuentra aumentada en pacientes con FAC, debido a un marcado aumento en la expresión de los canales Kir2.1, responsables de la generación de esta corriente, y a un aumento en la probabilidad de apertura del canal (Bosch y cols., 1999; Workman y cols., 2001; Dobrev y cols., 2001; Gaborit y cols., 2005; Voigt y cols., 2010). Por otra parte, se ha descrito que existe una activación constitutiva de la I_{KAch} en pacientes con FA en comparación con los pacientes en RS (Bosch y cols., 1999; Dobrev y cols., 2005). Esta activación constitutiva es debida a una fosforilación anormal del canal mediada por la PKC (Cha y cols., 2006; Dobrev y cols., 2005; Schotten y cols., 2011). El aumento de estas corrientes con rectificación interna puede contribuir al acortamiento de la DPA y por tanto a

la perpetuación de la arritmia. Todas estas modificaciones favorecerían la coexistencia de múltiples frentes de onda invadiendo desordenadamente la aurícula pero en igual medida permitirían la aparición de microcircuitos de reentrada (rotores) (Mandapati y cols., 2000; Samie y cols., 2001).

Además se ha observado un aumento en el ARNm del canal que genera la I_f (Lai y cols., 1999b). En miocitos aislados de venas pulmonares de perros a los que se había estimulado la aurícula a frecuencias de 780 latidos por minuto durante 6-8 semanas, se observaba un marcado incremento en la densidad de la I_f en aquellos que presentaban actividad automática (Chen y cols., 2001). Sin embargo, por el momento, no existen datos electrofisiológicos sobre la modificación de esta corriente en pacientes con FA, pero su aumento podría contribuir al aumento de la actividad ectópica auricular (Dobrev y Ravens, 2003).

3.3.2. Remodelado estructural y contráctil

La FA se acompaña de alteraciones estructurales progresivas del tejido auricular, como la dilatación y la fibrosis, que crean un sustrato perfecto para el mantenimiento de la FA, aumentando el tamaño de la aurícula y disminuyendo la velocidad de conducción del impulso eléctrico, respectivamente (Henry y cols., 1976; Ausma y cols., 1997; Allesie y cols., 2001). A nivel celular, los cambios fundamentales en los miocitos auriculares son: a) aumento del tamaño, b) aumento del glucógeno perinuclear, c) pérdida central de los sarcómeros (miolisis), d) alteración en la expresión de conexinas (Takeuchi y cols., 2006), e) cambios en la forma de las mitocondrias, f) distribución homogénea de la cromatina nuclear y g) cambios en la calidad y la localización de las proteínas estructurales celulares (Allesie y cols., 2002; Aldhoon y cols., 2010). Obviamente, las alteraciones en la estructura de la aurícula no están exclusivamente relacionadas con la FA, y hay que tener en cuenta que la mayoría de los pacientes con FAC son personas de edad avanzada y/o padecen otras enfermedades cardiovasculares que afectan a la estructura cardíaca. Sin embargo, se ha descrito que en pacientes con FA aislada existe una patología auricular que conlleva necrosis de los miocitos, miocarditis y fibrosis (Frustaci y cols., 1991 y 1997). Dentro de todos los factores que afectan a la estructura del miocardio auricular, los que han sido estudiados más extensivamente son la fibrosis y la alteración en la expresión de conexinas. Se cree que el primero es uno de los factores más importantes en la formación del sustrato para la FA (Nattel, 2004).

Por otra parte, se ha comprobado el papel de la inflamación y de las especies reactivas de oxígeno en la FA. Se ha descrito que se produce un aumento muy marcado en las

concentraciones de la proteína C reactiva, un importante marcador de inflamación, coincidiendo con las recurrencias de FA en el segundo o tercer día post-operatorio (Bruins y cols., 1997), tanto en pacientes con FA persistente como paroxística (Avilés y cols., 2003). Los principales efectores del daño oxidativo auricular parecen ser la NADPH-oxidasa miocárdica y la NO sintasa endotelial (Kim y cols., 2005). Un análisis del perfil de transcripción genética del tejido auricular de pacientes con FA mostraba una tendencia a la expresión de genes pro-oxidativos (Kim y cols., 2003). Además, se ha demostrado que el daño oxidativo en el miocardio auricular de pacientes con FA se debe principalmente a la acción local de radicales hidroxilo y peroxinitrito (Mihm y cols., 2001).

Además del remodelado estructural, se produce un remodelado mecánico caracterizado por la pérdida de la contractilidad auricular lo cual provoca el estasis sanguíneo en la cavidad, lo que contribuye significativamente al riesgo de tromboembolismo asociado a FA (Berger y Schweitzer, 1998). La pérdida de contractilidad auricular también potencia la dilatación auricular progresiva durante la FA y podría contribuir a la posterior estabilización de la arritmia (Schotten y cols., 2004).

3.4. Tratamiento farmacológico de la FA

La falta de tratamiento y/o episodios previos no detectados de FA inducen cambios electrofisiológicos y estructurales en el miocardio, haciendo que la restauración del RS sea cada vez más difícil. En estudios de seguimiento a largo plazo se ha descrito que una proporción significativa de pacientes con FA paroxística progresa a FAC (Kato y cols., 2004; de Vos y cols., 2010). El remodelado eléctrico producido por la FA puede ser revertido en algunos pacientes si se mantiene el RS desde etapas tempranas, lo que sugiere que un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado de la FA son críticos (Hobbs y cols., 2000; Aliot y cols., 2011).

Aunque se han desarrollado varias aproximaciones terapéuticas no farmacológicas (por ejemplo: cirugía, ablación con catéter, cardioversión eléctrica), la terapia con fármacos antiarrítmicos es el soporte principal del tratamiento de la FA (Tamargo y cols., 2009). El tratamiento farmacológico de la FA recomendado en las guías terapéuticas actuales presenta dos estrategias principales: a) la restauración y mantenimiento del RS, mediante el uso de antiarrítmicos de clase I (fundamentalmente, propafenona y flecainida) y III (amiodarona y sotalol) o b) permitir el desarrollo de la FA pero controlar el ritmo ventricular, mediante el uso de fármacos bloqueantes del nodo AV (bloqueantes del canal de Ca^{+2} : diltiazem y

verapamilo, beta-bloqueantes y amiodarona). La decisión de qué estrategia seguir depende de varios factores, incluyendo el patrón de presentación y la presencia o ausencia de otras condiciones previas (Figura I.32). Además, en el tratamiento de la FA es esencial proteger al paciente de complicaciones tromboembólicas, por lo que es necesario el uso de fármacos anticoagulantes (Fuster y cols., 2006; Tamargo y cols., 2009; Aliot y cols., 2011; Camm y cols., 2010; Lip y cols., 2012).

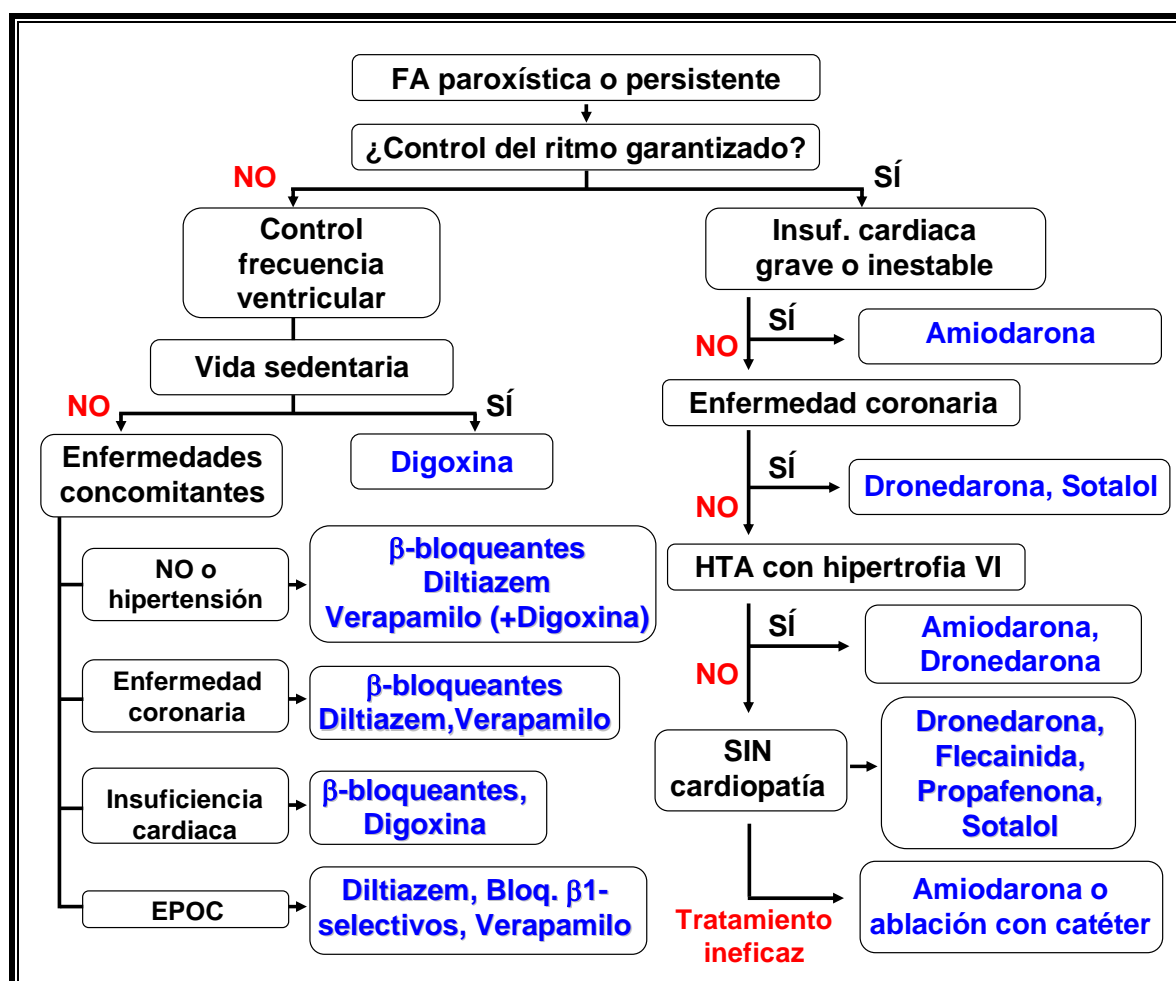


Figura I.32. Elección de fármacos antiarrítmicos en función de patología subyacente. Algoritmos de los tratamientos para el control de la frecuencia ventricular en FA (parte izquierda) y para el control del ritmo (parte derecha). [Adaptad de Lip y cols., 2012].

En general, los fármacos antiarrítmicos utilizados actualmente para el tratamiento de la FA son útiles, pero su efecto es limitado, debido, principalmente al remodelado auricular causado por la FA (Cosío y Delpón, 2001; Tamargo y cols., 2004a). Es necesario que se sigan buscando nuevas estrategias que mejoren la eficacia del tratamiento (cardioversión farmacológica rápida a RS, acortamiento de la duración de los episodios y prevención de las recurrencias) y que los posibles nuevos fármacos disminuyan los efectos adversos ventriculares graves y potencialmente mortales de los fármacos antiarrítmicos clásicos

(fibrilación ventricular e insuficiencia cardíaca congestiva). Existen nuevos fármacos como el vernakalant y la dronedarona que parecen prometedores (Prystowsky y cols., 2010). Sin embargo, el avance en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la génesis y mantenimiento de la FA es la herramienta indispensable para la búsqueda de nuevos fármacos antiarrítmicos con un perfil de efecto y seguridad adecuados.

4. SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

Numerosos estudios realizados en las dos últimas décadas han demostrado la existencia de un sistema cannabinoide endógeno (SCE) en mamíferos (Pertwee, 1997; Di Marzo y Deutsch, 1998; Hillard, 2000; Howlett y cols., 2002). Desde entonces, y debido al creciente interés que el SCE ha generado, se ha estudiado la implicación de este sistema en gran variedad de procesos fisiológicos y patológicos, lo que ha posibilitado la intervención sobre el mismo con fines terapéuticos (Baker y cols., 2003; Iversen, 2003; Di Marzo y cols., 2004; Ben Amar, 2006; Di Marzo y Petrocellis, 2006; Di Marzo y Petrosino, 2007). El SCE es un sistema regulador capaz de controlar la actividad motora, la memoria y el aprendizaje, el apetito, la emesis, la nocicepción, la presión arterial y el sueño entre otros procesos (Howlett y cols., 2002; Pertwee, 2005a; Pacher y cols., 2006; Mackie, 2008a). La modulación farmacológica del SCE permite por tanto un nuevo abordaje de diversas enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, la esclerosis múltiple/lateral amiotrófica o el Alzheimer (Romero y Orgado, 2009), trastornos de la alimentación como la anorexia (Monteleone y cols., 2008) o la obesidad (Wang y Ueda, 2008), trastornos gastrointestinales como la diverticulosis o la colitis ulcerosa (Smid, 2008), fenómenos compulsivos relacionados con la adicción a drogas (Ross y Peselow, 2009), enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial (Pacher y cols., 2008) o la aterosclerosis (Fisar, 2009), y diferentes tipos de cáncer (Guzmán, 2003; Pisanti y Bifulco, 2009) entre otros (Pacher y cols., 2006; Di Marzo y Petrosino, 2007; Kogan y Mechoulam, 2007; Pacher y Steffens, 2009; Pertwee, 2009; Miller y Devi, 2011).

El SCE está formado por los ligandos endógenos o *endocannabinoides*, las enzimas encargadas de su síntesis y degradación y sus receptores específicos.

4.1. Endocannabinoides y análogos

Los endocannabinoides se definen como compuestos endógenos, producidos en diferentes órganos y tejidos, capaces de unirse a los receptores cannabinoides (receptores CB). Se han

identificado varios tipos de cannabinoides endógenos, todos de naturaleza lipídica y derivados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Dadas las propiedades hidrófobas de estos compuestos, durante algún tiempo existió la idea de que sus efectos podrían ser consecuencia de una interacción con los componentes lipídicos de la membrana celular. Este mecanismo sería similar al propuesto en la década de los setenta para algunos anestésicos, cuando se pensaba que producían una desorganización de la fase lipídica con un aumento en la fluidez de la membrana plasmática. La resolución de la estructura de los endocannabinoides demostró posteriormente que este mecanismo sólo podía justificar una pequeña parte de los efectos producidos por estos compuestos.

La mayoría de los endocannabinoides están formados por una etanolamina unida mediante un enlace tipo amida a un ácido graso (Figura I.33). El primer endocannabinoide descubierto fue la anandamida (AEA, Devane y cols., 1992) que es la etanolamida del ácido araquidónico (AA, C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$).

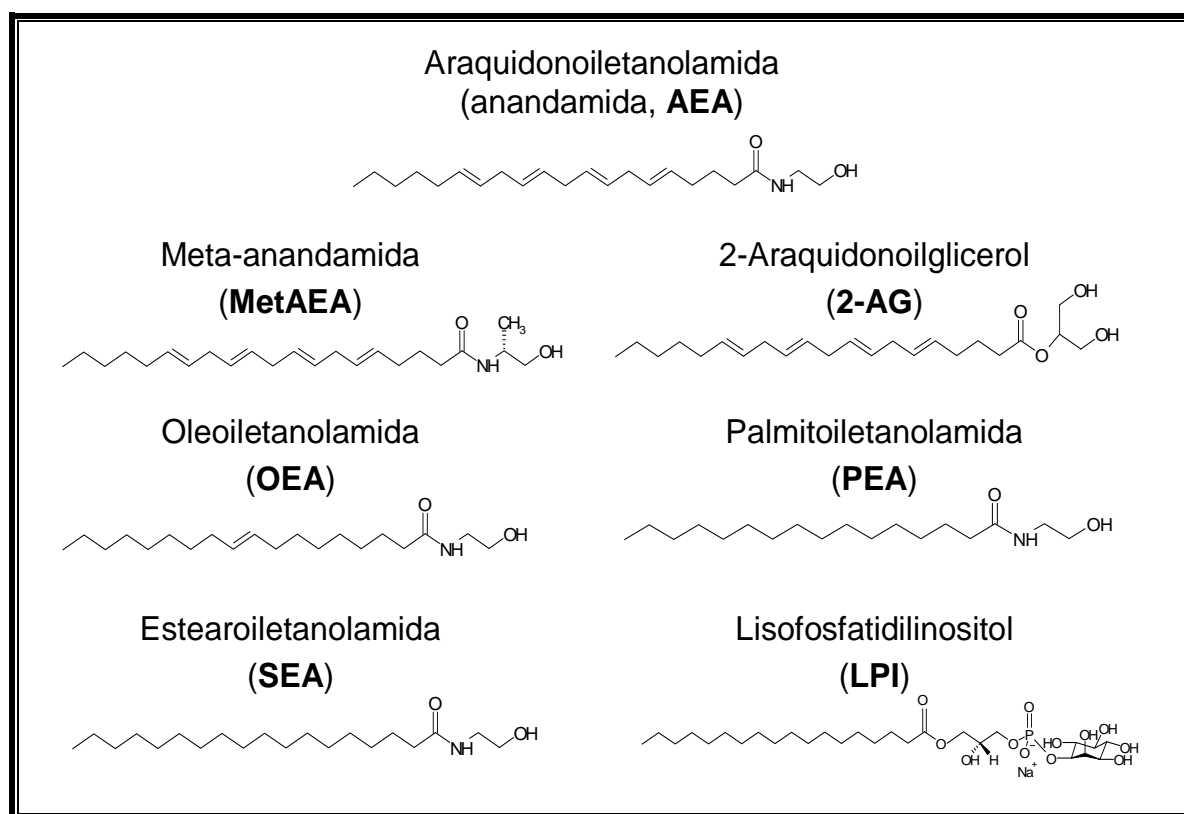


Figura I.33. Estructuras químicas de los endocannabinoides y sus análogos utilizados en el presente estudio.

La AEA es el agonista cannabinoide por excelencia. Su nombre procede del sánscrito “ananda” que significa felicidad, entretenimiento, placer. Tiene actividad farmacológica y efectos comportamentales muy parecidos a los del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), el principal cannabinoide bioactivo de la planta *Cannabis sativa*. La AEA es un agonista parcial

de receptores CB₁ (Felder y cols., 1993; Fride y Mechoulam 1993) y CB₂ en los que exhibe una menor actividad intrínseca (Tabla I.15) (Bayewitch y cols., 1995; Griffin y cols., 1998; Pertwee, 1999). La AEA ha sido identificada en cerebro y en tejidos periféricos humanos y de rata. Hay pequeñas cantidades de AEA en corazón humano y aparecen trazas en suero, plasma y líquido cefalorraquídeo (Felder y cols., 1996; Felder y Glass, 1998; Schmid y cols., 2000; Schreiber y cols., 2007).

A nivel experimental, y debido a que la AEA se hidroliza rápidamente por parte de la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, *fatty acid amide hidrolase*), en muchas ocasiones se utiliza la R-(+)-meta-anandamida (MetAEA), un compuesto sintético estable que no puede ser hidrolizado por la FAAH (Abadji y cols., 1994; Lin y cols., 1998).

El 2-araquidonoilglicerol (2-AG) es un éster resultante de la reacción entre el AA y una molécula de glicerol (Figura I.33). Fue aislado por primera vez de intestino de perro (Mechoulam y cols., 1995) y tiene capacidad para unirse a receptores CB₁ y CB₂ (Mechoulam y cols., 1995; Sugiura y cols., 1995 y 1997). Se ha descrito que presenta mayor actividad intrínseca tanto en receptores CB₁ como CB₂ que la AEA (Pertwee, 1999; Gonsiorek y cols., 2000; Savinainen y cols., 2001). La presencia del 2-AG se ha detectado en corazón, cerebro, intestino, páncreas, bazo, hígado, pulmón, riñón, plasma y células endoteliales (Schmid y cols., 2000; Sugiura y cols., 1998; Sugiura y Waku, 2000).

La AEA y el 2-AG son los dos endocannabinoides de los que más datos se dispone, habiéndose propuesto su posible mecanismo de acción como neuromoduladores actuando cerca de sus sitios de biosíntesis (Di Marzo, 1999). Se ha propuesto que la activación de los receptores CB₁ presinápticos por parte de estos endocannabinoides reduciría la actividad neuronal a través del bloqueo de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Alternativamente, la activación de los receptores CB₁ podría incrementar la entrada de K⁺, lo que haría disminuir la excitabilidad neuronal y, en definitiva, la propagación del impulso nervioso (Hoffman y Lupica, 2000; Freund y cols., 2003; Piomelli 2003; Mackie, 2006).

El L- α -lisofosfatidilinositol (LPI) es un fosfolípido endógeno presente en diversos tejidos que ha sido propuesto como un nuevo ligando para el receptor GPR55 (Brown, 2007; Oka y cols 2007; Ryberg y cols., 2007). El LPI, al igual que la AEA o el 2-AG, se libera al medio extracelular para actuar como un compuesto autocrino o paracrino interviniendo en gran variedad de funciones celulares como la modulación de la [Ca²⁺]_i (Corda y col., 2002) y de la actividad mitógena en células epiteliales (Falasca y Corda, 1994) o la estimulación de la proliferación celular (Falasca y cols., 1995).

Previamente al aislamiento de la AEA ya se disponía de información sobre la presencia en animales superiores de otros compuestos con estructuras parecidas (comparten un grupo amida unido a un ácido graso) como la oleoiletanolamida (OEA), la palmitoiletanolamida (PEA) o la estearoiletanolamida (SEA). Estos compuestos que no se unen o que tienen muy baja afinidad por CB₁ y CB₂ se clasifican como *análogos de endocannabinoides*, ya que se ha demostrado que actúan potenciando los efectos de algunos endocannabinoides (Ben Shabat y cols., 1998; Lambert y Di Marzo, 1999; Smart y cols., 2002; Franklin y cols., 2003) probablemente interfiriendo en su ruta de degradación, ya que todos ellos son susceptibles de ser hidrolizados por la FAAH (Jonsson y cols., 2001; Mackie y Stella, 2006; Dalle Carbonare y cols., 2008).

La PEA está formada por la unión del ácido palmítico (AP, C16:0) con un grupo etanolamina (Figura I.33), cuya presencia fue descrita por primera vez en cerebro, hígado y músculo esquelético de ratas (Bachur y cols., 1965). Posteriormente, se ha descrito su participación en procesos inflamatorios y en la actividad del sistema inmune (Facci y cols., 1995), en el control del dolor (Calignano y cols., 1998) y en procesos neuroprotectores (Skaper y cols., 1996; Lambert y cols., 2001; Hansen, 2010). Estos efectos desaparecían en presencia del antagonista CB₂ SR144528 (Calignano y cols., 1998; Jaggar y cols., 1998) y puesto que se sabía que la PEA no tenía afinidad por estos receptores (Tabla I.15) (Showalter y cols., 1996; Lin y cols., 1998; Ryberg y cols., 2007) se propuso que dichos efectos podrían ser debidos a la activación de un receptor *CB2-like*. Sin embargo, el grupo de Di Marzo propuso que la PEA actuaba inhibiendo la expresión de la FAAH, lo que resultaría en un aumento en los niveles de AEA (Di Marzo y cols., 2001; De Petrocellis y cols., 2002).

La OEA se sintetiza principalmente en el intestino delgado de diversas especies animales (Rodríguez de Fonseca y cols., 2001). Está formada por una cadena hidrocarbonada de 18 átomos de carbono con una insaturación en el carbono 9 (ácido oléico, AO, C18:1 Δ^9) y una etanolamina (Figura I.33). A pesar de su evidente similitud estructural con la AEA, no tiene afinidad por receptores CB (Tabla I.15) (Lin y cols., 1998; Howlett, 2002). El efecto principal que se le atribuye es el de producir anorexia (Rodríguez de Fonseca y cols., 2001) a través de la estimulación del receptor nuclear activado por proliferador de peroxisomas alfa (PPAR α , *peroxisome proliferator-activated receptor*) (Fu y cols, 2003; Lo Verme y cols., 2005).

La SEA, formada por un ácido esteárico (AS, C18:0) y una etanolamina (Figura I.33), ha sido detectada en cerebro de rata, ratón, y humano a niveles más altos que la AEA y se le ha atribuido un efecto antiinflamatorio (Dalle Carbonare y cols., 2008). Aunque presenta poca afinidad por los receptores CB (Lin y cols., 1998; Maccarrone y cols., 2002), la SEA se

comporta como un análogo de endocannabinoides en experimentos realizados en ratón potenciando los efectos de la AEA (Maccarrone y cols., 2002).

Compuesto	CB ₁ CE ₅₀ (nM)	CB ₂ CE ₅₀ (nM)	GPR55 CE ₅₀ (nM)	Referencia
AEA	543	1940	-	Felder y cols., 1995
	252	581	-	Mechoulam y cols., 1995
	61	1930	-	Lin y cols., 1998
	71.7	279	-	Hillard y cols., 1999
	31	27	18	Ryberg y cols., 2007
	-	-	>30 000*	Kapur y cols., 2009
MetAEA	28.3	868	-	Goutopoulos y cols., 2001
	17.9	868	-	Lin y cols., 1998
	-	-	>30 000*	Kapur y cols., 2009
LPI	-	-	1000	Oka y cols., 2007
	-	-	1200*	Kapur y cols., 2009
PEA	>30 000	19 800	4	Ryberg y cols., 2007
	-	-	>30 000*	Kapur y cols., 2009
OEA	>30 000	>30 000	440	Ryberg y cols., 2007
2-AG	472	1400	-	Mechoulam y cols., 1995
	58.3	145	-	Ben Shabat y cols., 1998
	519	618	3	Ryberg y cols., 2007
	-	-	>30 000*	Kapur y cols., 2009
WIN55,212-2	9.94	16.2	-	Rinaldi-Carmona y cols., 1994
	1.89	0.28	-	Showalter y cols., 1996
	4.4	1.2	-	Hillard y cols., 1999
	9.87	0.29	-	Iwamura y cols., 2001
	18	1	>30 000*	Ryberg y cols., 2007
RMB	11.8	13200	-	Felder y cols., 1998
	5.6	>1000	-	Rinaldi-Carmona y cols., 1994
	-	-	3900*	Kapur y cols., 2009
AM281	12	4200	-	Lan y cols., 1999
	-	-	>30 000	Ryberg y cols., 2007
AM630	5152	31.2	-	Ross y cols., 1999

Tabla I.15. Perfil de la eficacia funcional (fijación a [³⁵S]GTPγS) de los principales agonistas/antagonistas de los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 (modificado de Ryberg y cols., 2007). * CE₅₀ calculada mediante ensayos con β-arrestina.

4.2. Síntesis, transporte y degradación de los endocannabinoides

Los endocannabinoides se sintetizan “a demanda” a partir de componentes de las membranas celulares siendo, en este sentido, similares a otros mediadores como los leucotrienos o las prostaglandinas y diferentes a los neurotransmisores clásicos, que se almacenan en vesículas antes de ser liberados. Los endocannabinoides se sintetizan y liberan en respuesta a un incremento en la [Ca²⁺]_i producida por una despolarización o tras la activación de un receptor metabotrópico acoplado a proteínas G, lo que sugiere que se producen en momentos de gran actividad del SNC (Mackie, 2006). Inmediatamente después

de su síntesis, son rápidamente recaptados al interior celular para su posterior degradación por enzimas hidrolíticas intracelulares (Maccarrone y cols., 1998; Di Marzo, 1999; Piomelli y cols., 1999; Hillard y Jarrahian, 2000).

Existen varias hipótesis sobre el mecanismo de biosíntesis de la AEA, aunque la más aceptada es la que propone su formación a partir de la fosfatidiletanolamina presente en las membranas tras ser hidrolizada por fosfodiesterasas (Figura I.34) (Schmid y cols., 1983; Sugiura y cols., 2002). Esta ruta también es la ruta de síntesis de otras etanolamidas como la PEA, la OEA o la SEA (Schmid y cols., 1990), aunque en el caso de la PEA se ha descrito que su síntesis puede ser independiente de la producción de AEA o de 2-AG ya que se ha aislado una enzima hidrolítica distinta de la FAAH y específica para ella (NAAA, *N-acylethanolamine-hydrolysing acid amidase*) (Ueda y cols., 2001; Brown 2007). La síntesis de AEA también puede producirse conjuntamente con estos compuestos a partir de sus correspondientes ácidos grasos (AA, AP y AO) y un grupo etanolamina (Deutsch y Chin, 1993).

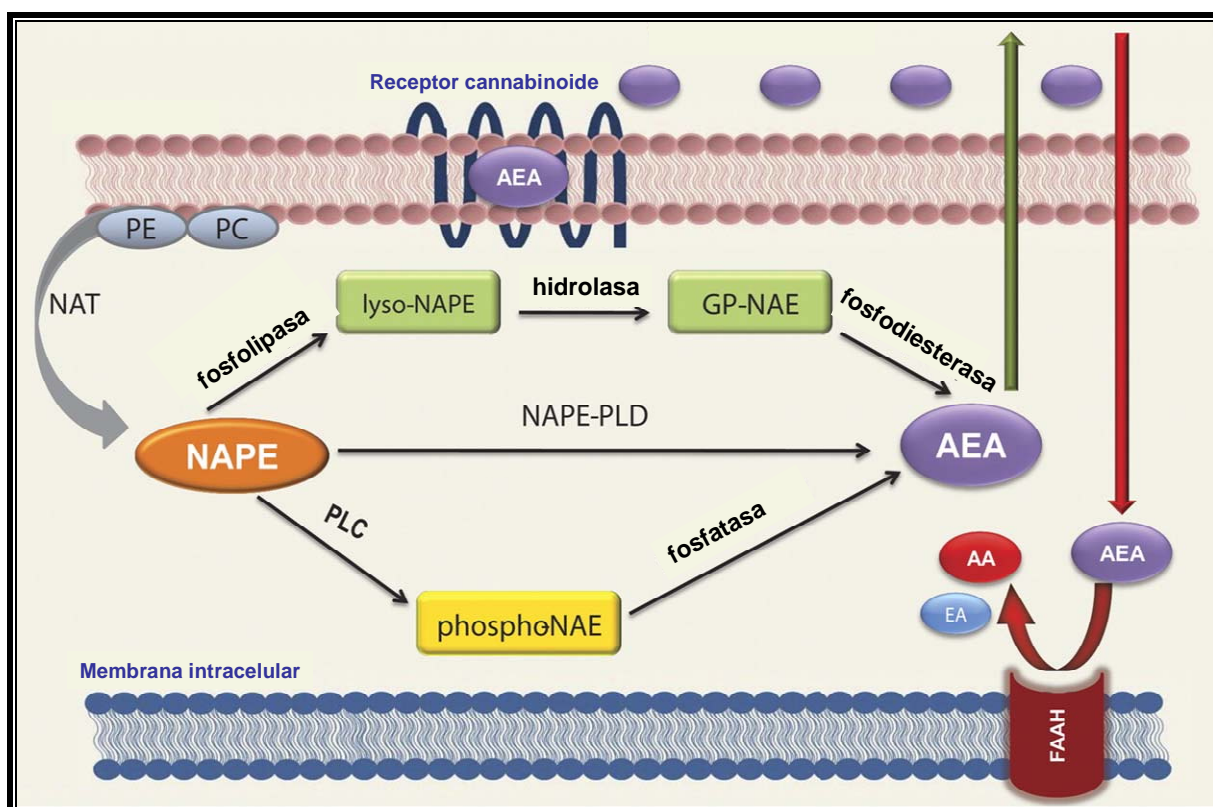


Figura I.34. Esquema de biosíntesis y degradación de la AEA. La formación de AEA puede tener lugar a partir de tres vías: por conversión directa por la acción de la NAPE-PLD, a través de fosfatasa con un paso previo donde interviene la PLC, y una tercera vía donde intervienen fosfolipasas, hidrolasas y fosfodiesterasa para finalmente formar la AEA. La enzima intracelular FAAH se encarga de la degradación de la AEA, dando lugar a AA y EA. AA: ácido araquidónico; EA: etanolamina; NAPE: N-araquidonoil-fosfatidiletanolamida; NAT: N-acetiltransferasa PC: fosfatidilcolina; PE fosfatidiletanolamida; PLC: fosfolipasa C, PLD: fosfolipasa D. [Adaptada de Snider y cols., 2010].

La biosíntesis del 2-AG se produce fundamentalmente a partir de fosfolípidos de membrana que contienen AA a través de la acción de fosfolipasas y diacilglicerol lipasas que están localizadas en la membrana plasmática y son estimuladas por Ca^{2+} y glutatión (Sugiura y cols., 1995; Bisogno y cols., 2003).

La degradación de los endocannabinoides tiene lugar en el citoplasma, por lo que es necesario que estos compuestos entren en el interior de la célula. A pesar de que hay controversia sobre si existe o no un sistema específico de transporte para la AEA, sí que hay un consenso sobre sus características: es un proceso rápido, saturable y dependiente de temperatura y puede ser regulado por diversos segundos mensajeros y vías de señalización (Di Marzo y cols., 1994; Hillard y cols., 1997; Piomelli y cols., 1999; Maccarrone y cols., 2000; Rakhshan y cols., 2000). Existen varias hipótesis sobre el mecanismo de recaptación de la AEA al interior celular. Al ser un compuesto lipídico podría atravesar la membrana por difusión facilitada, mecanismo que puede ser inhibido farmacológicamente (Piomelli y cols., 1999; Jarrahian y cols., 2000). Sin embargo se han obtenido datos muy sólidos de la existencia de un transporte mediado a través de una proteína transportadora (Beltramo 1997; Beltramo y Piomelli 2000; Hillard y Jarrahian, 2000; Moore y cols. 2005) que también estaría presente en el aparato cardiovascular (Calignano y cols., 1997). Este mecanismo de transporte podría ser bidireccional y funcionar tanto para introducir los endocannabinoides liberados como para liberarlos tras su síntesis (Di Marzo y Petrosino, 2007). También se ha propuesto que estos compuestos podrían ser recaptados por un mecanismo rápido de endocitosis tras concentrarse en *lipid rafts* (balsas lipídicas) ricos en caveolina (McFarland y cols., 2004; Dainese y cols., 2007).

El 2-AG podría utilizar el mismo sistema de transporte que la AEA (Beltramo y Piomelli, 2000; Hajos y cols., 2004) o podría ser recaptado por un transportador similar, pero específico para este endocannabinoide (Bisogno y cols., 2001).

Una vez dentro de la célula, la AEA es hidrolizada por la acción de la FAAH dando lugar a AA y etanolamina. Ésta es una enzima intracelular que ha sido purificada, clonada y secuenciada en distintas especies como rata, ratón, cerdo y humano (Deutsch y Chin, 1993; Ueda y cols., 1995; Cravatt y cols., 1996; Giang y Cravatt, 1997; Maccarrone y cols., 1998; Di Marzo, 1999). Su actividad es relativamente selectiva para amidas y ésteres de ácidos grasos de cadena larga, por lo que esta enzima también puede hidrolizar el 2-AG (Di Marzo y cols., 1998; Goparaju y cols., 1999), aunque es la monoacilglicerol lipasa (MAGL) la que realiza esta función mayoritariamente, convirtiendo este endocannabinoide en AA y glicerol (Konrad y cols., 1994).

Recientemente se ha propuesto un nuevo concepto sobre la posible acumulación de la AEA: tras ser recaptada desde el exterior celular se une a una proteína específica (Kaczocha y cols., 2009; Oddi y cols., 2009) que la transporta hasta unas organelas denominadas adiposomas donde se acumularía (Oddi y cols., 2008). Los adiposomas, además de cómo lugar de almacenamiento, servirían de soporte para el tráfico, el metabolismo y la señalización de este endocannabinoide (Macarrone y cols., 2010).

4.3. Receptores endocannabinoides

Hasta el momento hay dos tipos de receptores identificados: el receptor CB₁ (Matsuda y cols., 1990) y el receptor CB₂ (Munro y cols., 1993). En 2006 se identificó un posible nuevo receptor CB distinto de los dos anteriores, el receptor GPR55, al que también se pueden unir los endocannabinoides (Baker y cols., 2006). Todos ellos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *G protein coupled receptors*) y se caracterizan por tener un dominio N-terminal extracelular, un dominio C-terminal intracelular y siete dominios transmembrana (Figura I.35).

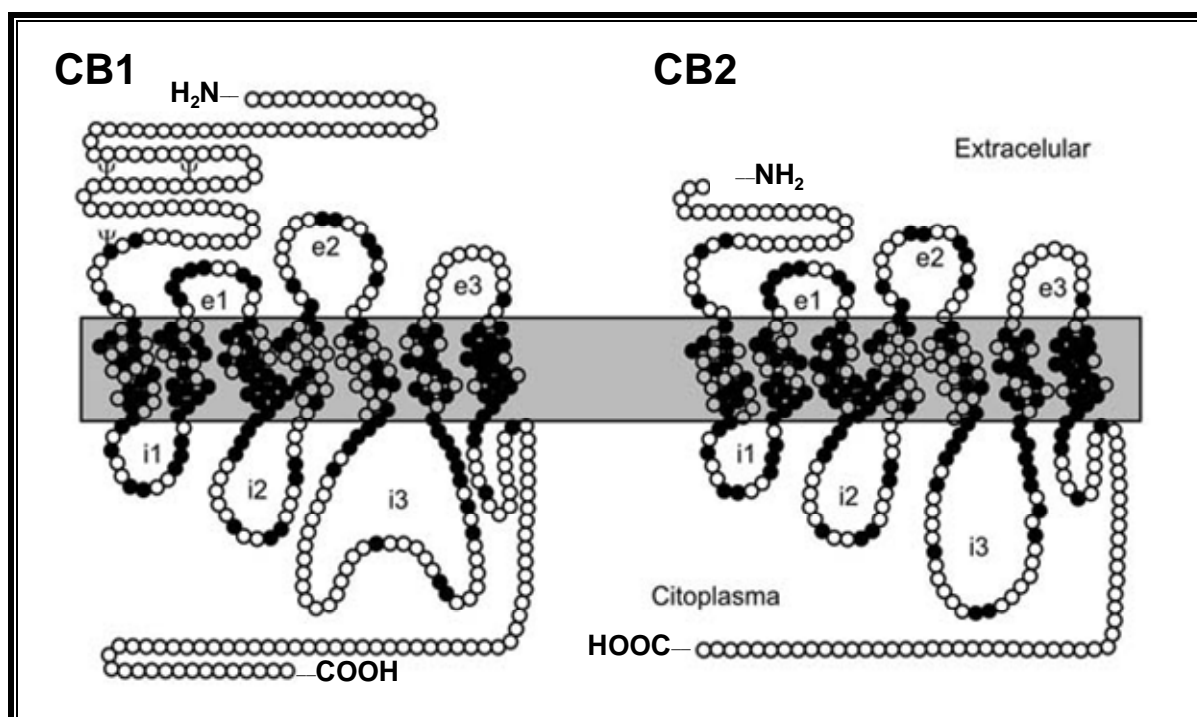


Figura I.35. Representación esquemática de la estructura de los receptores CB₁ y CB₂. Los receptores cannabinoides están formados por siete dominios transmembrana, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal intracelular.

El receptor CB₁ está compuesto por 472 aminoácidos (Figura I.35). Se han descrito dos variantes de *splicing* de este receptor en la parte N-terminal (Shire y cols., 1995; Rinaldi-Carmona y cols., 1996; Ryberg y cols., 2005). Presenta una homología en su secuencia peptídica del 97-99% entre especies y se ha clonado de diferentes especies como rata, ratón y humano (Howlett y cols., 2002). Este receptor es el que media los efectos psicotrópicos del THC. El estudio de la estructura del receptor CB₁ ha servido para desarrollar numerosas moléculas con gran afinidad por él. El ejemplo más importante podría ser el rimonabant (SR141716A, RMB, Acomplia, Sanofi-Aventis), un fármaco diseñado para el tratamiento de la obesidad que además parecía mejorar el perfil lipídico de los pacientes; sin embargo tuvo que ser retirado por los graves trastornos neuropsiquiátricos que producía (Moreira y Crippa, 2009; King, 2010; Topol y cols., 2010).

El receptor CB₁, tanto en especies animales como en humanos, está ampliamente distribuido por el sistema nervioso central (SNC), destacando su presencia en los ganglios basales, cerebelo, neocórtex e hipocampo, una zona esencial en procesos de aprendizaje y memoria (Herkenham y cols., 1991, Westlake y cols., 1994; Glass y cols., 1997). También se expresa a nivel periférico, por ejemplo en miocardio (Bonz y cols., 2003; Bátakai y cols., 2004b; Mukhopadhyay y cols., 2007), testículos (Gérard y cols., 1991), células endoteliales y músculo liso (Liu y cols., 2000; Rajesh y cols., 2008), tejido adiposo (Cota y cols., 2003; Engeli y cols., 2005; Roche y cols., 2006), hígado (Engeli y cols., 2005; Siegmund y cols., 2005; Mallat y cols., 2008) y tracto gastrointestinal (Pertwee, 2001).

El receptor CB₂ está compuesto por 360 aminoácidos (Figura I.35) y presenta una homología del 48% con el receptor CB₁ (Munro y cols., 1993). Se ha clonado de rata y de ratón, presentando una homología respecto al humano de un 93 y un 82% respectivamente (Griffin y cols., 2000).

El receptor CB₂ juega un importante papel en la respuesta inmune e inflamatoria, expresándose abundantemente en células mieloides, hematopoyéticas, macrófagos y monocitos (Munro y cols., 1993; Pertwee, 1997; Klein y cols., 2003, Massi y cols., 2006). Algunos autores también han descrito su presencia en neuronas y astrocitos del sistema nervioso, especialmente en situaciones patológicas y neuroinflamatorias (Sagan y cols., 1999; Van Sickle y cols., 2005; Orgado y cols., 2009). Se ha identificado también en células musculares lisas y endoteliales (Rajesh y cols., 2007 y 2008), en hígado (Engeli y cols., 2005; Siegmund y cols., 2005; Mallat y cols., 2008) y en otros tejidos como timo, médula ósea, pulmón, útero, ovarios y páncreas (Galiègue y cols., 1995). Incluso se ha descrito su presencia en placas de ateroma, donde su estimulación por parte del THC inhibe su progresión (Steffens

y cols., 2005). El receptor CB₂ también está presente en tejido cardíaco (Lépicier y cols., 2003; Shmist y cols., 2006; Mukhopadhyay y cols., 2007; Weis y cols., 2010).

La estimulación de los receptores CB modula la activación de diversas vías de señalización, dependiendo del agonista, el tejido y la especie animal utilizada.

La vía de señalización principal del receptor CB₁ se debe a la interacción con proteínas G del subtipo Gi/o. Su acoplamiento a este tipo de proteínas conduce, entre otros procesos, a la inhibición de la enzima AC, disminuyendo los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y, por consiguiente, disminuyendo la capacidad de fosforilación de las quinasas dependientes de AMPc, como la PKA (Howlett y cols., 1986; Glass y Felder, 1997; Pertwee, 1997; Howlett y cols., 2002). La inhibición de la AC es sensible al antagonista de receptores CB₁ RMB y a toxina pertussis (PTX), confirmando así la implicación de la proteína Gi/o. Sin embargo, también se ha demostrado que los receptores CB₁ pueden acoplarse a proteínas Gs. En células CHO que expresaban el receptor CB₁ y en las que la proteína Gi/o estaba previamente bloqueada con PTX, la estimulación del receptor producía la activación de la proteína Gs observándose un aumento de la actividad de la AC y de los niveles de AMPc (Glass y Felder, 1997; Bonhaus y cols., 1998). Los efectos de los endocannabinoides sobre los niveles celulares de AMPc también se pueden explicar por la isoforma de la AC presente en el tejido analizado. En células COS-7 transfectadas con diversas isoformas de la AC, se vio que la estimulación de los receptores CB₁ inhibía las AC tipo I, V, VI y VIII y estimulaba los tipos II, IV y VII (Rhee y cols., 1998).

Existen múltiples estudios que demuestran que los endocannabinoides y sus análogos activan también la cascada de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) debido al acoplamiento del receptor CB₁ a Gi/o (Howlett y cols., 2002). Esta activación puede ser a través de las diferentes vías correspondientes a los diferentes miembros de la familia de las MAPK como son ERK (*extracellular signalling-regulated kinases*) a través de la fosforilación y activación de sus dos isoformas p42 y p44 (Bouaboula y cols., 1995; Wartmann y cols., 1995; Sánchez y cols., 1998; Galve-Roperh y cols., 2002); JNK/SAPK (*Jun amino-terminal kinases/stress-activated kinases*) (Liu y cols., 2000; Rueda y cols., 2000) y p38 (Liu y cols., 2000; Derkinderen y cols., 2001). Todos los efectos se inhiben con RMB y PTX. La activación de la primera de las subfamilias mencionada se relaciona con el crecimiento y división celular, mientras que las otras dos se activan por señales de estrés y citoquinas inflamatorias y están relacionadas con muerte celular y patologías del sistema inmune (Johnson y Lapadat, 2002).

Además, la activación de los receptores CB₁ modula varios tipos de canales iónicos a través de proteínas Gi/o: inhibe corrientes generadas por canales de Ca²⁺ tipo N y P/Q (Twitchell y cols., 1997) y canales de K⁺ de tipo D (Mu y cols., 1999; Schweitzer y cols., 2000) y, por otro lado, activa canales de K⁺ tipo A (Deadwyler y cols., 1995; Mu y cols., 1999) y canales de K⁺ rectificadores internos (Mackie y cols., 1995). Se conoce también la modulación directa que los endocannabinoides pueden ejercer sobre algunos canales iónicos en tejido nervioso o tejido muscular liso (Van der Stelt y Di Marzo, 2005; Oz, 2006) (ver Apartado I.4.4.2: Efectos de los endocannabinoides sobre diversos canales iónicos).

También se ha descrito que la estimulación del receptor CB₁ por sus agonistas en diferentes preparaciones neuronales y en células musculares lisas, activa la PLC. La activación de la PLC resulta en la hidrólisis del PIP₂ dando lugar a la formación de los segundos mensajeros IP₃ y DAG (Sugiura y cols., 1997; Mombouli y cols., 1999; De Petrocellis y cols., 2007) que producen un aumento en la concentración intracelular de calcio ([Ca²⁺]_i) y la activación de la PKC respectivamente. Este efecto se inhibe por RMB, PTX y U73122 (inhibidor de la PLC) y podría ser vía proteína Gi/o (Lograno y Romano, 2004) o a través de Gq (Lauckner y cols., 2005).

Los receptores CB₁ además pueden modular el metabolismo de esfingolípidos incrementando los niveles de ceramida, bien a través de la activación de la hidrólisis de estos compuestos (Sánchez y cols., 1998, 2001) o bien mediante el aumento de la síntesis “de novo” de ceramida (Gómez del Pulgar y cols., 2002).

Al igual que ocurre con los receptores CB₁, los receptores CB₂ pueden modular la actividad de la AC. Este efecto es inhibitorio y se bloquea con PTX, sugiriendo la participación de proteínas Gi/o (Bayewitch y cols., 1995; Slipetz y cols., 1995). Además, la estimulación de este receptor puede activar la vía de las MAPK, tanto la p42/p44 como la p38 (Bouaboula y cols., 1996; Brown y cols., 2002; Carrier y cols., 2004), y aumentar la [Ca²⁺]_i a través de la vía PLC-IP₃ (Zoratti y cols., 2003). Sin embargo, y al contrario que en los receptores CB₁, los receptores CB₂ no parecen estar acoplados a proteínas Gs (Glass y Felder 1997; Calandra y cols., 1999). Hasta hace poco no parecía que la estimulación del receptor CB₂ modulase canales iónicos (Felder y cols 1995; McAllister y cols., 1999; Pertwee, 1997) pero recientemente se ha descrito que la estimulación del receptor CB₂ en miocitos ventriculares de rata puede modular la I_{K,ATP} (Li y cols, 2012).

4.3.1. Receptores no-CB₁/no-CB₂ o receptores *CB-like*

Recientemente, se ha propuesto la existencia de otros receptores de cannabinoides distintos de CB₁ y CB₂ (no-CB₁/no-CB₂, *CB-like*) (Bátkai y cols., 2004a; Begg y cols., 2005; Mackie y Stella, 2006; Brown 2007; De Petrocellis y Di Marzo 2010). Por ejemplo, se han descrito efectos farmacológicos de la AEA y del WIN55,212-2 en cerebro de ratones transgénicos deficientes en receptores CB₁ y CB₂ (Di Marzo y cols., 2000; Breivogel y cols., 2001; Hoffman y cols., 2005). De forma similar se ha descrito la presencia de un receptor no-CB₁/no-CB₂ para la AEA en el endotelio vascular (Járai y cols., 1999; Begg y cols., 2005). La AEA y diferentes análogos inducían vasodilatación en arterias mesentéricas de ratón y este efecto se bloqueaba con RMB pero no con capsazepina (descartando que el efecto se debiese a la unión a receptores vanilloides) y los mismos resultados se obtuvieron en ratones deficientes en los receptores CB₁ y CB₂ (Járai y cols., 1999; Wagner y cols., 1999; Offertáler y cols., 2003; Bátкаи y col., 2004a; Begg y cols., 2005), postulándose así la existencia de un receptor CB endotelial. Estos nuevos receptores podrían estar implicados en la modulación de la transmisión sináptica (Di Marzo y cols., 2000; Breivogel y cols., 2001; Hoffman y cols., 2005), del aparato cardiovascular (Járai y cols., 1999; Offertáler y cols., 2003; Begg y cols., 2005) y del sistema inmune (Jaggar y cols., 1998; Brown 2007).

El receptor que surgió como principal candidato de receptor de endocannabinoides no-CB₁/no-CB₂ fue el receptor huérfano acoplado a proteínas G GPR55, que puede ser activado por AEA y 2-AG, pero también por compuestos como la PEA o la OEA aunque su ligando endógeno natural es el LPI (Sawzdargo y cols., 1999; Baker y cols., 2006; Oka y cols., 2007; Pertwee, 2007; Ryberg y cols., 2007) (Tabla I.15).

El receptor GPR55 está compuesto por 319 aminoácidos. Presenta una homología en la secuencia peptídica muy baja con los receptores CB₁ (13%) y CB₂ (14%) (Sawzdargo y cols., 1999; Baker y cols., 2006). Se expresa en diversos órganos y tejidos como en glándulas adrenales, tracto gastrointestinal, bazo y cerebro (Sawzdargo y cols., 1999; Ryberg y cols., 2007), y también en células endoteliales humanas (Waldeck-Weiermair y cols., 2008; Bondarenko y cols., 2010). Sin embargo, hasta la fecha no se ha detectado su presencia en miocardio.

Al ser activado, el receptor GPR55 se une a proteínas Gα₁₃ (Ryberg y cols., 2007), aunque también se puede unir a Gq o Gα₁₂ (Lauckner y cols., 2008). A través de esta vía inhibe la corriente de K⁺ tipo M en neuronas de ratón, lo que provoca el aumento de la [Ca²⁺]_i y el correspondiente aumento en la excitabilidad neuronal que desencadena la liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico mediada a través de receptores de IP₃ y RyR2 y la activación de la PLC y de proteínas G pequeñas (rhoA, cdc42 y rac1) (Oka y cols., 2007;

Lauckner y cols., 2008; Henstridge y cols., 2009; Kapur y cols., 2009). También se ha demostrado un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ vía PLC en células endoteliales tras la estimulación del receptor GPR55 con LPI y con AEA (Waldeck-Weiermair y cols., 2008; Bondarenko y cols., 2010) (Figura I.36).

Se han descrito otras vías de señalización en las que el LPI, a través de su unión a GPR55, activa ERK y p38 de la ruta de las MAPK (Kapur y cols., 2009; Pietr y cols., 2009; Henstridge y cols., 2010; Oka y cols., 2010).

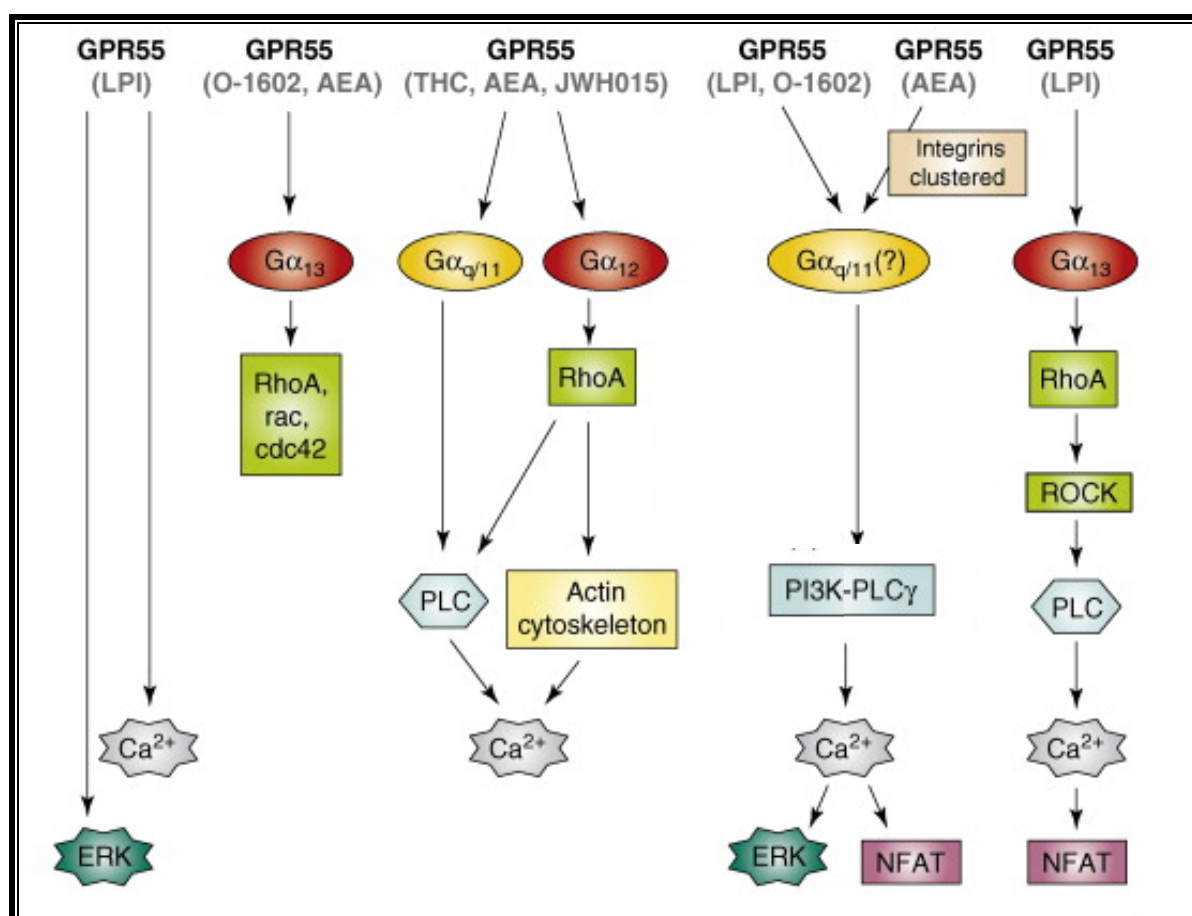


Figura I.36 Vías de señalización propuestas para GPR55. Cascadas de señalización intracelular tras la activación del receptor GPR55 por diferentes ligandos. NFAT, factor nuclear de células T activadas; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PLC, fosfolipasa C; ROCK, Rho-quinasa. [Adaptada de Ross 2009].

Los datos existentes sobre el receptor GPR55 y la farmacología de sus ligandos es complicada y muy variada y los datos sobre los mecanismos de señalización que desencadena este receptor son contradictorios ya que los resultados obtenidos varían según el modelo de estudio utilizado.

El receptor GPR119 es un receptor huérfano que se expresa fundamentalmente en el páncreas y en el tracto gastrointestinal (Chu y cols., 2007; Lauffer y cols., 2009) y que está acoplado probablemente a proteínas Gs (Godlewski y cols., 2009). La OEA es su principal

ligando endógeno en experimentos “in vitro” (Overton y cols., 2006) y parece ser que participa en el control de la homeostasis de la glucosa y en la obesidad (Ning y cols., 2008; Schwartz y cols., 2008; Godlewski y cols., 2009).

4.4. Acciones de los endocannabinoides

El SCE es un sistema modulador que actúa principalmente sobre el sistema nervioso (Katona y Freund, 2008; Mackie, 2008b; Solinas y cols., 2008; Kano y cols., 2009), el inmune (Centonze y cols., 2008; Pandey y cols., 2009; Tanasescu y Constantinescu, 2010) y el endocrino (Bellocchio y cols., 2008; Cota, 2008; Maccarrone, 2009; Di Marzo y cols., 2011), aunque en los últimos 10 años también se ha puesto de manifiesto su importancia en la regulación del sistema cardiovascular (Hillard, 2000; Randall y cols., 2002; Bonz y cols., 2003; Pacher y cols., 2005a, 2005b; Ashton y Smith, 2007; Bátkai y Pacher, 2009; Hiley, 2009; Pacher y Steffens, 2009).

4.4.1. Acciones cardiovasculares de los endocannabinoides

Entre otros efectos, se ha descrito que el SCE interviene en la regulación de la presión arterial, la frecuencia y contractilidad cardíacas o en la ingesta y el síndrome metabólico (SM) (con la consiguiente repercusión en patologías asociadas a la obesidad; Quercioli y cols., 2011), y en procesos como la isquemia/reperfusión o la aterosclerosis. Sin embargo hasta la fecha no hay datos sobre la participación del SCE en la regulación de la actividad eléctrica cardíaca.

Se ha demostrado la presencia de receptores CB₁ y CB₂ en el miocardio humano, de rata y de ratón (Bonz y cols., 2003; Lèpicier y cols., 2003; Bátkai y cols., 2004b; Shmist y cols., 2006; Mukhopadhyay y cols., 2007; Weis y cols., 2010). Los receptores CB₁ parecen jugar un importante papel en la regulación cardiovascular, mientras que los receptores CB₂ parecen ser los responsables de los efectos de los endocannabinoides sobre el preconditionamiento isquémico.

Existe una marcada variabilidad en el tipo de respuesta producida por los endocannabinoides sobre la presión arterial, la contractilidad y la frecuencia cardíacas, dependiendo del modelo, estado de consciencia, vía de administración y especie animal utilizada (Mendizábal y Adler-Graschinsky, 2007; Wheal y Randall, 2009). Ya en 1979 se describió el efecto trifásico del THC sobre la presión arterial en ratas anestesiadas: una

reducción inicial de la frecuencia y contractilidad cardíacas y de la presión arterial, seguida de un aumento de la presión arterial y de la contractilidad cardíaca y, finalmente, de una prolongada reducción de la presión arterial (Siqueira y cols., 1979). Más tarde se comprobó que la AEA y otros endocannabinoides administrados por vía intravenosa en animales anestesiados producían la misma respuesta trifásica (Varga y cols., 1995; Járai y cols., 2000; Pacher y cols., 2005a). La bradicardia inicial y la hipotensión asociada parecen ser efectos vagales, ya que se pueden bloquear con atropina o mediante una vagotomía cervical (Varga y cols., 1995, 1996) y la última fase parece estar mediada a través de receptores CB₁ presinápticos que disminuyen el tono simpático periférico (Varga y cols., 1995, 1996; Lake y cols., 1997), ya que se comprobó que en animales *knock out* para CB₁ este efecto desaparecía (Ledent y cols., 1999). Sin embargo, también podría estar implicado un efecto vasodilatador directo, ya que se ha visto que algunos agonistas sintéticos reducen la presión arterial tras haber bloqueado previamente el sistema nervioso simpático (Vidrio y cols., 1996; Lake y cols., 1997). En animales conscientes, la respuesta hipotensora tardía desaparece casi por completo. Por tanto esta respuesta podría deberse a los efectos del anestésico (que bloquearían en parte los efectos centrales de los endocannabinoides) o a posibles diferencias en el tono vegetativo (Gardiner y cols., 2002; Randall y cols., 2002, 2004; Wheal y cols., 2007).

La acción vasodilatadora de los endocannabinoides también podría explicarse por mecanismos independientes de la activación de los receptores CB₁ como la estimulación de receptores no-CB₁/no-CB₂ que podrían localizarse en células endoteliales (Járai y cols., 1999; Wagner y cols., 1999; Ford y cols., 2002; Bátka y cols., 2004a). Su estimulación podría provocar la liberación de óxido nítrico que facilitaría la apertura de canales de K⁺, produciría una hiperpolarización del E_m y un efecto vasodilatador (Járai y cols., 1999; Begg y cols., 2003). Otros posibles mecanismos de acción serían la activación de receptores vanilloides (Högestatt y Zygmunt 2002; Ho y Hiley, 2003), la biotransformación de AEA en prostanoïdes vasodilatadores (Grainger y Boachie-Ansah, 2001) o la activación de canales de K⁺ activados por Ca²⁺ (BKCa) (White y cols., 2001).

Se ha descrito también que, dependiendo del receptor estimulado, se producen efectos opuestos sobre la contractilidad en aurícula aislada de rata: se observa una reducción de la contractilidad producida por agonistas del receptor CB₁ que se correlaciona con una disminución en los niveles de AMPc, la estimulación de la óxido nítrico sintasa y un acúmulo de GMPc, mientras que la activación de los receptores CB₂ aumenta la contractilidad y los niveles cardíacos de AMPc (Sterin-Borda, 2005).

En experimentos realizados en tejido auricular humano, se ha visto que la AEA y otros cannabinoides sintéticos producen una disminución dosis-dependiente de la contractilidad, que se revierte con el antagonista de receptores CB₁ AM251, lo cual implica que los efectos inotrópicos negativos observados en el miocardio están mediados a través de CB₁ (Bonz y cols., 2003). Finalmente, la administración aguda de cannabinoides en sujetos sanos produce una respuesta taquicardizante, opuesta a la bradicardia observada en animales conscientes o anestesiados (Jones, 2002).

En ratas normotensas la administración de RMB o de inhibidores de la FAAH como el URB597 o del transporte de AEA no modifican la presión arterial (Varga y cols., 1995; Lake y cols., 1997; Bátakai y cols., 2004b). Además, los ratones *knock out* para CB₁ y FAAH no presentan cambios en la presión arterial o en la frecuencia cardíaca con respecto a sus controles (Jarai y cols., 1999; Ledent y cols., 1999; Mendizábal y Adler-Graschinsky, 2007). Todo ello sugiere que en condiciones normales los endocannabinoides no participan en el control de la presión arterial o de la función cardíaca. Sin embargo, en ratas espontáneamente hipertensas y en otros modelos de hipertensión arterial, aumenta la expresión de los receptores CB₁ a nivel vascular-endotelial y cardíaco y la AEA y el URB597 normalizan la presión arterial y disminuyen la frecuencia y la contractilidad cardíacas (Lake y cols., 1997; Bátakai y cols., 2004b; Wheal y cols., 2007). Por el contrario, el RMB en estos animales aumenta la presión arterial, la contractilidad ventricular, la presión intraventricular y el gasto cardíaco (Bátakai y cols., 2004a). Estos resultados indican que en situaciones de hipertensión aumenta la expresión de los receptores CB₁ y la activación del sistema endocannabinoide, lo que podría constituir un mecanismo de compensación que limitaría el incremento de la presión arterial y de la contractilidad cardíaca, y desde este punto de vista la modulación de los endocannabinoides podría representar una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la hipertensión arterial (Bátakai y cols., 2004a y b; Pacher y cols., 2006; Mendizábal y Adler-Graschinsky, 2007). Por otro lado, el que la activación de los receptores CB₁ produzca esta respuesta hipotensora (Varga y cols., 1996) ha permitido implicar al SCE en estados patológicos que cursan con hipotensión arterial, tales como los cuadros de choque (hemorrágico, endotóxico o cardíaco [Wagner y cols., 1997; Wang y cols., 2001; Bátakai y cols., 2004a; Mukhopadhyay y cols., 2007]) o la cirrosis hepática (Bátakai y cols., 2001).

En los estudios RIO, en los pacientes obesos hipertensos así como en el subgrupo de pacientes diabéticos o con hiperlipidemias tratados durante un año con RMB, se produce una disminución muy marcada en su presión arterial, mientras que este efecto no se observa en pacientes obesos normotensos (Ruilope y cols., 2008).

Por su parte, la presencia del receptor CB₂ en el miocardio se ha relacionado con la puesta en marcha de mecanismos cardioprotectores en modelos de isquemia/reperfusión (Bouchard y cols., 2003; Montecucco y cols., 2009). El preconditionamiento isquémico es un fenómeno de protección natural inducido por uno o varios períodos breves de isquemia-reperfusión que protegen al corazón del daño provocado por una posterior isquemia prolongada, reduciendo el tamaño del infarto, las arritmias y la disfunción mecánica o “atontamiento” postisquémico. En 2001, Lagneux y Lamontagne describieron por primera vez la implicación del SCE en un modelo de isquemia desarrollado en corazones aislados de rata. El antagonista de receptores CB₂ SR144528 (pero no el antagonista de receptores CB₁ RMB) reducía la cardioprotección inducida previamente con lipopolisacáridos (Lagneux y Lamontagne 2001). Igualmente, la activación de los receptores CB₂ estaba implicada en la reducción del área de infarto producida por el estrés térmico aplicado antes del periodo de isquemia, ya que este efecto era prevenido con SR144528, pero no con RMB (Joyeux y cols., 2002). Posteriormente, se han descrito efectos cardioprotectores de diferentes endocannabinoides como el 2-AG o la PEA y otros agonistas de los receptores CB₂ en modelos animales “in vivo” y “ex vivo”. Estos compuestos reducen el área infartada y mejoran la función ventricular (Lépiciér y cols., 2003; Wagner y cols., 2006; Defer y cols., 2009). En casi todos los estudios publicados el efecto cardioprotector que ejercen los endocannabinoides está mediado a través del receptor CB₂, aunque en los últimos años también se ha descrito que el receptor CB₁ podría estar implicado (Lépiciér y cols., 2006; Wagner y cols., 2006; Mendizábal y Adler-Graschinsky, 2007).

4.4.2. Efectos de los endocannabinoides sobre diversos canales iónicos

Los endocannabinoides y sus análogos modulan diferentes canales iónicos y transportadores y aumentan la $[Ca^{2+}]_i$, efectos que explicarían la capacidad de estos compuestos para modular la liberación de diversos neurotransmisores y la excitabilidad neuronal (Bouaboula y cols., 1999; Howlett y cols., 2004; Pacher y cols., 2006; Demuth y Molleman, 2006). La mayoría de esos efectos están mediados a través de la estimulación del receptor CB₁ (Mackie y cols., 1993; Deadwyler y cols., 1995; Twitchell y cols., 1997; Mu y cols., 1999 y 2000; Schweitzer, 2000; Li y cols., 2009; Pertwee, 2010) aunque también pueden ejercer sus efectos de forma directa. De hecho, se ha demostrado que estos compuestos pueden modular diferentes canales como, por ejemplo, los de Ca^{2+} , Na^+ o K^+ de una forma directa e independiente de receptor (Van der Stelt y Di Marzo, 2005; Oz, 2006; Pertwee y cols., 2010).

I. Canales de Ca^{2+} : La AEA, la MetAEA, el 2-AG y el AA inhiben la corriente generada por canales de Ca^{2+} tipo L (Ca_v1) en músculo esquelético de conejo. Este efecto no se revierte ni con RMB, ni PTX, ni es reproducido por otros compuestos como el THC o el WIN55,212-2 (Jarrahian y Hillard 1997; Oz y cols., 2000 y 2004). Se ha descrito también que la AEA puede modular esta corriente en miocitos ventriculares de rata a través de la estimulación del receptor CB_1 (Li y cols., 2009).

La AEA y diferentes ácidos grasos (pero no otros endocannabinoides como el 2-AG) inhiben la corriente generada por canales de Ca^{2+} tipo T (Ca_v3) en líneas celulares y producen una aceleración de la inactivación y un desplazamiento de la curva de inactivación de estos canales hacia potenciales más negativos (Chemin y cols., 2001 y 2007). La AEA produce efectos similares en canales de Ca^{2+} tipo N ($\text{Ca}_v2.2$), persistiendo los efectos en presencia de RMB y de PTX. Sin embargo, el 2-AG no produce este efecto (Guo e Ikeda, 2004). Se ha demostrado también que el WIN55,212-2 a concentraciones menores de 1 μM en cultivos de neuronas de hipocampo de rata, bloquea los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q ($\text{Ca}_v2.1$) mediante la activación de receptores CB_1 , y que a concentraciones mayores lo hace de una manera directa por lo que dependiendo del rango de concentraciones sería posible que los endocannabinoides bloquearan canales de Ca^{2+} a través de mecanismos dependientes e independientes de receptor (Shen y Thayer, 1998).

II. Canales de Na^+ : La AEA y el WIN55,212-2 inhiben la corriente generada por canales de Na^+ sensibles a TTX en neuronas de rata y ratón a concentraciones micromolares (Nicholson y cols, 2003; Kim y cols., 2005). Este efecto se potencia tras inhibir la FAAH y se bloquea parcialmente con el antagonista del receptor CB_1 AM251 lo que sugiere un efecto directo sobre el canal independiente de CB_1 (Nicholson y cols., 2003). El AA y el 2-AG también bloquean estos canales en neuronas produciendo una disminución de la excitabilidad neuronal (Lee y cols., 2002; Duan y cols., 2008).

III. Canales de K^+ : Se ha descrito que a través de la estimulación del receptor CB_1 transfectado en diferentes sistemas de expresión (células de cultivo HEK293, oocitos de *Xenopus* y cultivos de neuronas), la AEA y el WIN55,212-2 activan canales regulados por proteínas G que generan una corriente rectificadora interna (GIRK) (Henry y Chavkin, 1995). Este efecto se bloquea con bario, RMB y tras la estimulación de la PKC con un éster de forbol (PMA) (McAllister y cols., 1999), pero es independiente de la vía AC-AMPc-PKA (Robbe y cols., 2001).

En neuronas de hipocampo, WIN55,212-2 aumenta una corriente de salida de K^+ voltaje-dependiente tipo-A (I_A) (Deadwyler y cols., 1995) y disminuye la corriente tipo-M (I_M)

(Schweitzer y cols., 2000). Estos efectos se bloquean con RMB, PTX y activadores de la PKA (Hampson y cols., 1995; Mu y cols., 1999 y 2000).

La AEA produce relajación en arterias coronarias aisladas de rata, efecto que no se debe ni a la activación de receptores CB ni a la biotransformación de la AEA en derivados vasoactivos, sino a la activación de canales BKCa (White y cols., 2001). Los efectos aparecen cuando los compuestos se aplican desde el medio extracelular y no se revierte con RMB (Van den Bossche y Vanheel, 2000). En estudios recientes, se ha visto que el LPI (Bondarenko y cols., 2011) y la MetAEA (Sade y cols., 2006) también pueden modular la actividad del canal BKCa. El LPI produce además una inhibición de canales no selectivos para cationes y de la ATPasa Na^+/K^+ de forma independiente de la activación del receptor GPR55 en células endoteliales (Bondarenko y cols., 2010). En el segundo estudio mencionado, la MetAEA produce un aumento en la actividad de la corriente generada por canales BKCa en células HEK293. Esta potenciación no se ve modificada por antagonistas de receptores CB_1 o por la presencia de agonistas CB_2 , ni por PTX (Sade y cols., 2006).

Se ha descrito también que la AEA inhibe la corriente generada por canales Kv1.2 expresados en fibroblastos de ratón, acelerando además la cinética de inactivación de estos canales (Poling y cols., 1996). El efecto no se bloquea con PTX ni con RMB. La AEA, aplicada por la cara extracelular de la membrana en la configuración de *outside-out* de la técnica de *patch-clamp*, no produce efecto, mientras que al ser aplicada por la parte citoplasmática produce una marcada inhibición de la corriente, indicando que la AEA actúa en este caso intracelularmente (Poling y cols., 1996). Efectos similares se han descrito en otros estudios donde la AEA induce una rápida y completa inactivación de la corriente generada por canales Kv3.1 (Oliver y cols., 2004). Además la AEA también actúa sobre otros canales como los Kv1.1+Kv β 1.1 o los Kv3.4 y sin embargo no modifica los canales KCNQ2/3 (Oliver y cols., 2004).

Recientemente se ha descrito la modulación de la $I_{\text{K,ATP}}$ registrada en miocitos ventriculares de rata través de la estimulación del receptor CB_2 . La AEA aumenta la corriente $I_{\text{K,ATP}}$ de forma dependiente de concentración. Este efecto no se previene con AM251 pero sí con el antagonista de receptores CB_2 AM630 (Li y cols., 2012). Anteriormente ya se había descrito la modulación de esta corriente de forma independiente de receptor por el AA, lo que puede ejercer efectos cardioprotectores durante procesos de isquemia-reperfusión (Lu y cols., 2001; Nithipatikom y cols., 2006).

En otro importante estudio, la AEA y la MetAEA producen una marcada inhibición de la corriente generada por canales TASK-1 mientras que no producen efecto sobre otros canales

de la misma familia (TWIK, TREK, TRAAK). Ese efecto no se revierte con RMB y tampoco es reproducido por otros endocannabinoides como el 2-AG o la PEA (Maingret y cols., 2001).

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El sistema endocannabinoide es un sistema regulador capaz de modular gran variedad de procesos fisiológicos. En los últimos años se ha demostrado que participa en el control de la actividad motora, la memoria y el aprendizaje, el apetito, la emesis, la sensación nociceptiva, el sueño y diversas respuestas motivacionales.

En el miocardio los endocannabinoides modulan la contractilidad y frecuencia cardíacas y ejercen acciones cardioprotectoras y antiarrítmicas en modelos de isquemia-reperfusión. Sin embargo, los efectos de los endocannabinoides sobre la actividad eléctrica cardíaca han sido escasamente estudiados.

Los endocannabinoides y sus análogos no se almacenan sino que son producidos “a demanda”, siendo su síntesis estimulada en situaciones de daño tisular. Dado que se ha demostrado que los endocannabinoides pueden ser sintetizados en el corazón, parece razonable proponer que la síntesis miocárdica de estos compuestos aumentará en situaciones de daño celular (fibrosis, isquemia, apoptosis, estrés oxidativo, etc.) que también se producen en pacientes que presentan taquiarritmias auriculares como la FA. Además, se ha demostrado que la síntesis de endocannabinoides aumenta en tejido nervioso al estimularlo a altas frecuencias y al aumentar la $[Ca^{2+}]_i$, condiciones que también están asociadas a la FA. Esta arritmia es un importante problema sanitario ya que es la arritmia con mayor prevalencia en la población general, la que con mayor frecuencia se diagnostica y más hospitalizaciones origina. Además, en el momento actual el tratamiento de la FA es subóptimo. Por ello, es de gran importancia conocer los mediadores fisiológicos que pueden estar interviniendo en la génesis/mantenimiento de la FA ya que así se podrían identificar nuevas dianas terapéuticas para su tratamiento. La FA, *per se*, remodela las propiedades electrofisiológicas (remodelado eléctrico) y estructurales (hipertrofia, fibrosis, dilatación) del tejido auricular, de modo que promueve su propio mantenimiento y recurrencia. El remodelado eléctrico se produce por cambios en la expresión de los canales iónicos que participan en la repolarización auricular.

Hasta este momento desconocemos si el sistema endocannabinoide participa en el control de la actividad eléctrica cardíaca en condiciones fisiológicas y/o patológicas como la FA. En este sentido sería interesante conocer los efectos del sistema endocannabinoide sobre los canales Kv1.5 que generan la corriente I_{Kur} , principal responsable de la repolarización en la aurícula humana y propuesta en los últimos años como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de arritmias auriculares.

Por todo ello, los objetivos que nos propusimos en la presente Tesis Doctoral fueron:

1. Analizar los efectos directos de los endocannabinoides y ácidos grasos relacionados estructuralmente sobre los canales humanos Kv1.5, expresados en líneas celulares de mamíferos.
2. Analizar los efectos directos del endocannabinoide AEA sobre la corriente nativa I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos.
3. Analizar los efectos del endocannabinoide AEA sobre el PA registrado en preparaciones auriculares multicelulares de ratón.
4. Analizar la expresión de receptores CB en tejido auricular humano en muestras de pacientes en RS y con FAC.
5. Analizar los efectos de los endocannabinoides mediados a través del receptor CB₁ y GPR55 sobre los canales humanos Kv1.5, expresados en líneas celulares de mamífero, y sobre la corriente nativa I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. TÉCNICA DE FIJACIÓN DE VOLTAJE EN PARCHE DE MEMBRANA (*PATCH-CLAMP*)

La técnica de fijación de voltaje comenzó a utilizarse en los años 80 para el estudio de corrientes iónicas en células aisladas y se caracteriza por permitir mantener de forma estable el potencial de parte o de toda la membrana de la célula y registrar la corriente generada a través de los canales iónicos tras la aplicación de un pulso hiper o despolarizante (Hamill y cols., 1981). Esta técnica se basa en la formación de un sello de alta resistencia (un “gigasello” de $\approx 20 \text{ G}\Omega$) entre la luz de una micropipeta de vidrio y la membrana de una célula (Figura III.1). La micropipeta se llena con una solución iónica (“solución interna”) cuya composición varía en función de la corriente objeto de estudio. A través de la micropipeta, se inyecta la corriente necesaria para fijar el E_m al valor deseado y, al mismo tiempo, se registra la corriente generada tras la aplicación de pulsos hiper o despolarizantes (Hamill y cols., 1981). La técnica de fijación de voltaje presenta diferentes configuraciones (Figura III.2):

- a) Configuración de parche sobre célula entera, *cell-attached* u *on-cell patch*.
- b) Configuración de célula entera o *whole-cell patch*.
- c) Configuración de parche interior-fuera o *inside-out patch*.
- d) Configuración de parche exterior-fuera o *outside-out patch*.

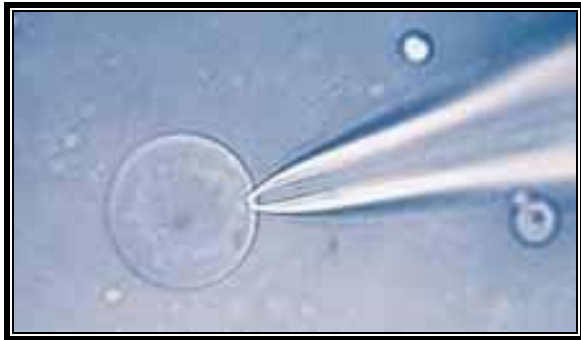


Figura III.1. Formación de un sello de alta resistencia. Se muestran una micropipeta de vidrio y una célula CHO en el transcurso de la formación de un sello de alta resistencia o “gigasello”.

Una vez que se ha puesto en contacto la micropipeta con la superficie de la membrana celular, se aplica una ligera succión, con lo que la porción de la membrana incluida en la luz de la micropipeta se invagina y se forma el sello de alta resistencia. Ésta es la configuración de “parche de membrana sobre célula entera” (*cell-attached* u *on-cell patch*) que permite el registro de la corriente iónica unitaria o microscópica (i), generada por la activación de un único canal (*single channel*) presente en el parche de membrana. Esta configuración presenta la ventaja de ser la más fisiológica de las cuatro mencionadas porque no modifica el medio intracelular y es la más adecuada para estudios que requieran la participación de todos los

sistemas celulares moduladores del canal iónico. Su principal desventaja es que no permite determinar el PR (un indicador de la situación fisiológica de la célula) ya que los valores a los que se fija son relativos al potencial de membrana de la célula. Este problema se minimiza perfundiendo las células con una solución externa despolarizante que mantiene el PR celular en 0 mV.

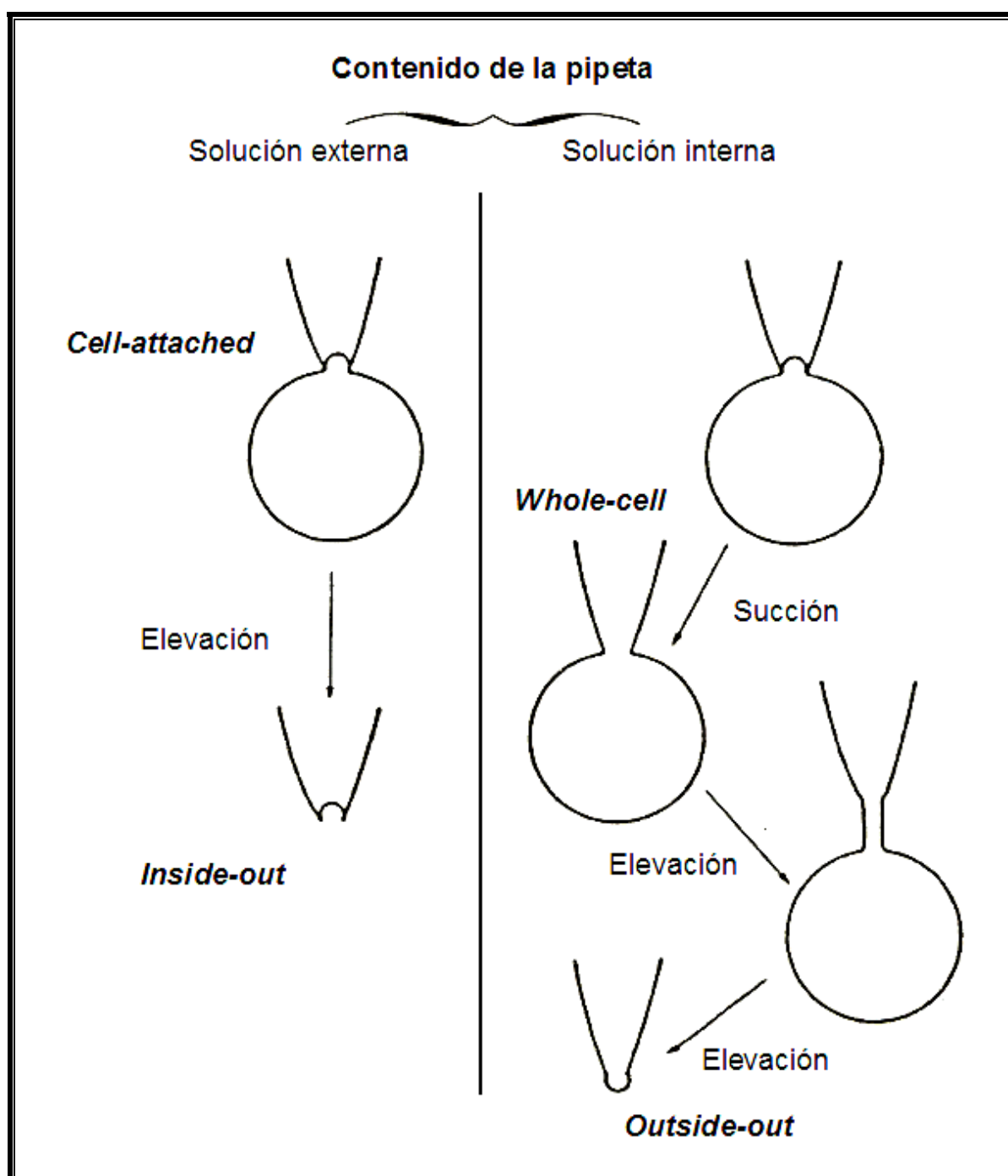


Figura III.2. Configuraciones de la técnica de *patch-clamp*. Diagrama que ilustra la metodología para conseguir las diferentes configuraciones de los sellos mediante la técnica de *patch-clamp*.

A partir de la configuración de parche de membrana sobre célula entera, y aplicando una ligera succión adicional, se puede romper la porción de membrana invaginada en la luz de la micropipeta y conseguir la configuración de “célula entera” (*whole-cell patch*). Tras la rotura del parche de membrana, la solución interna de la micropipeta entra en contacto con el medio intracelular y, al ser mucho mayor su volumen en comparación con el volumen intracelular, se produce un recambio casi inmediato de la composición del mismo, es decir, se produce una diálisis intracelular. En estas condiciones es posible fijar el E_m al valor deseado y, tras la aplicación de los protocolos experimentales adecuados, registrar la corriente iónica resultante de la actividad de todos los canales presentes en la membrana celular o corriente macroscópica (I). Esta configuración permite controlar y modificar a voluntad el medio intracelular, pero también diluye los mediadores intracelulares responsables de la regulación de los canales iónicos. Para minimizar este problema, la solución interna de la micropipeta se complementa con ATP y otros mediadores que, en condiciones fisiológicas, mantienen la función de los canales iónicos. Otra posibilidad para minimizar la dilución de los mediadores celulares es utilizar la configuración de “parche de membrana perforado”. Para ello, se añade a la solución interna un antibiótico (nistatina o anfotericina B) que, una vez que se ha formado el sello de alta resistencia, va formando pequeños poros en la membrana de la célula, permitiendo así el paso de iones monovalentes. De esta forma, la resistencia de acceso va disminuyendo paulatinamente, mientras que la amplitud de la corriente registrada va aumentando, hasta que ambos parámetros alcanzan valores estables al cabo de ≈ 30 min, momento en el se empieza a registrar la corriente iónica objeto de estudio.

Partiendo de la configuración de parche de membrana sobre célula entera (*cell-attached*), y elevando la célula del fondo del baño, se puede separar el parche de membrana incluido en la luz de la micropipeta del resto de la célula, quedando así el lado citosólico de la membrana expuesto al medio externo y el lado extracelular en contacto con la solución interna de la micropipeta. Ésta es la configuración de “parche de membrana interior-fuera” (*inside-out patch*).

La última configuración es la de “parche de membrana exterior-fuera” (*outside-out patch*) que se obtiene a partir de la configuración de célula entera (*whole-cell*). En esta configuración, la cara extracelular de la membrana es la que queda en contacto con la solución externa. Estas dos últimas configuraciones son las también llamadas “de parche escindido” y permiten el registro de corrientes unitarias y macroscópicas en macroparches. Ambas son adecuadas para el estudio del mecanismo de acción de fármacos o mediadores que actúen selectivamente sobre las superficies extra o intracelular de la membrana. Sin embargo,

presentan el inconveniente de que desligan los canales iónicos del contenido citosólico que modula su actividad.

En la presente Tesis Doctoral, la $I_{hKv1.5}$ y la I_{Kur} fueron registradas utilizando la configuración de célula entera (*whole-cell*) de la técnica de *patch-clamp*.

2. REGISTRO DE $I_{hKv1.5}$ EN SISTEMAS DE EXPRESIÓN HETERÓLOGOS

Los experimentos presentados en esta Tesis Doctoral han sido realizados utilizando como sistema de expresión células de ratón Ltk^- y células de ovario de hamster chino (CHO). Todas ellas son líneas celulares de mamífero en las cuales se transfectaba de forma estable o transitoria el ADN complementario (ADNc) de los canales hKv1.5.

2.1. Células Ltk^-

La línea celular Ltk^- procede de fibroblastos de ratón. Estas células no presentan ningún canal Kv en su membrana y además, ni se registra ningún tipo de corriente de K^+ dependiente de voltaje ni se detecta el ARNm de ningún canal Kv; de hecho, en estas células el $E_m \approx 0$ mV (Felipe y cols., 1993). Por todo ello, resultan idóneas para el estudio de la función de los canales Kv. Sin embargo, es de destacar que las células Ltk^- expresan de forma endógena la subunidad moduladora cardíaca Kv β 2.1.

2.1.1 Cultivo y transfección de los canales hKv1.5 en células Ltk^-

Las líneas celulares transfectadas de forma estable con el ADNc del canal hKv1.5 fueron proporcionadas por el Dr. M.M. Tamkun de la Universidad Estatal de Colorado (Fort Collins, CO, USA), cuyo grupo de investigación clonó este gen del ventrículo humano y realizó la caracterización electrofisiológica (Tamkun y cols., 1991; Snyders y cols., 1993). Para la transfección clonaron el ADNc del canal hKv1.5 en el vector de expresión pMSVNeo (Figura III.3). Este vector contiene: a) un promotor del virus del tumor mamario murino (MMTV) inducible por dexametasona que controla la expresión del ADNc insertado en un sitio *polylinker*; b) un gen que confiere resistencia a neomicina (Neo); y c) un promotor temprano constitutivo del virus simio 40 (SV40) que regula la expresión del gen Neo. El gen Neo confiere resistencia a la neomicina a las células que han incorporado el vector, permitiendo su selección al mantenerlas en un medio de cultivo con G418 (geneticina, un análogo de la

neomicina) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EEUU). La transcripción del ADNc del canal se activa mediante la inducción del promotor MMTV con dexametasona. Este vector fue transfectado en células *Ltk*⁻ mediante el método de fosfato de calcio (Takeyasu y cols., 1987), consiguiendo líneas estables que expresaban los canales hKv1.5 tras su inducción con dexametasona.

Las células *Ltk*⁻ transfectadas de forma estable se mantenían bajo una atmósfera de CO₂ al 5% y a una temperatura de 37°C, en medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (GIBCO, Paisley, Escocia, UK) enriquecido con suero de caballo al 10%, 0.25 mg/ml de G418 y 0.05 mg/ml de gentamicina (Sigma) para prevenir contaminaciones bacterianas. Los cultivos celulares se pasaban cada 7 días tras un breve tratamiento con tripsina (0.5 mg/ml) y, 24 h antes de la realización de los experimentos, se incubaban con dexametasona (2 µM) para inducir la transcripción del gen del canal. Las células se recogían de la placa utilizando un rascador de goma, procedimiento mediante el cual la mayoría de las células permanecen intactas, y tras dejar reposar la suspensión celular durante 1 hora a temperatura ambiente (22-25°C), se iniciaban los registros electrofisiológicos, realizándose éstos durante las 12 h posteriores (Vaquero y cols., 2007; Delpón y cols., 2008; Amorós y cols., 2011; Núñez y cols., 2013).

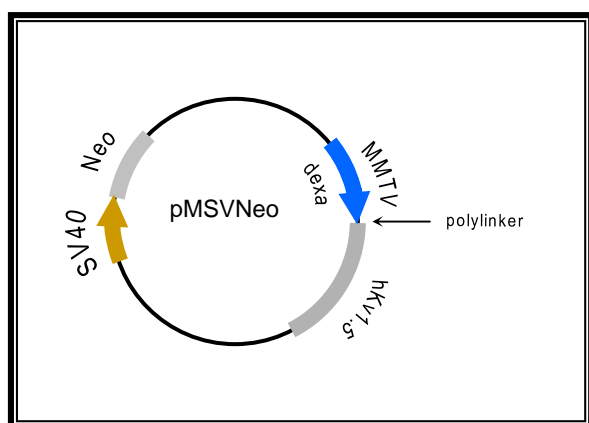


Figura III.3. Esquema del vector pMSVNeo. La expresión del ADNc del canal insertado está regulada por el promotor MMTV (inducible por dexametasona). El gen que confiere resistencia a la Neomicina se encuentra regulado por el promotor constitutivo SV40.

2.2. Células CHO

Para el estudio de los efectos mediados a través de los receptores CB sobre la $I_{hKv1.5}$ se utilizaron células CHO que expresan de forma estable los receptores CB1 (CHO-CB1) y los receptores GPR55 (CHO-GPR55). Ambas líneas celulares fueron proporcionadas por el Dr. M. Guzmán (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid) y el Dr. K. Mackie (Departamento de Fisiología y Biofísica, Universidad de Washington, Seattle, EEUU), respectivamente.

2.2.1 Cultivo y transfección de los canales hKv1.5 en células CHO

Para su cultivo se empleaban placas de 60 mm de diámetro con medio DMEM que contenía 400 µg/ml de G418 y suero fetal bovino al 10%. El medio de cultivo de las células CHO-CB1 se complementaba con aminoácidos no esenciales en MEM al 1% (Rueda y cols., 2000), mientras que el medio de cultivo de las células CHO-GPR55 se suplementaba con una mezcla de antibióticos (800 UI de penicilina y 200 µg/ml de estreptomicina) (Lauckner y col., 2008). Todas las líneas celulares se mantenían a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y eran tratadas con tripsina (0.5 mg/ml) cada 7 días (Delpón y cols., 2008; Gómez y cols., 2009; Amorós y cols., 2013).

Para el estudio electrofisiológico, las células CHO se transfectaban de forma transitoria con el vector de expresión que contenía el gen del canal hKv1.5. Estas células representan un buen modelo para el estudio de canales de K⁺, ya que no presentan ninguna corriente de este tipo (Yu y Kerchner, 1998). Sin embargo, sí presentan una pequeña proporción de canales de Na⁺ endógenos (Lalik y cols., 1993), aunque la amplitud de las corrientes generadas a través de los mismos es demasiado pequeña para interferir en el registro de las corrientes de K⁺ generadas por los canales hKv1.5.

Para la transfección se utilizaba el método del FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Barcelona, España). Este método de transfección consiste en la incubación de una mezcla de FuGENE 6 con el vector de expresión con el gen del canal (1 µg) y con el ADNc del antígeno de superficie CD8 expresado en el vector EBOPcD Leu-2 (0.5 µg), en presencia de medio de cultivo DMEM sin suero y sin antibiótico. El FuGENE 6 está compuesto por una mezcla de lípidos que propicia que el ADNc se incorpore a las células y permitir así la expresión en la membrana de los canales objeto de estudio. Con estos vectores de expresión, una mezcla con una relación de 3 volúmenes de FuGENE 6 (en µL) por cada volumen de ADNc (en µg) se demostró como la mejor para obtener la mayor cantidad de células transfectadas. Tras incubar la mezcla durante 30 min, ésta se añadía a las células CHO mantenidas en medio DMEM con suero y con antibiótico, permitiendo que el ADNc adherido al FuGENE 6 se introdujese en las células. Transcurridas 48 h, tiempo durante el cual se producía la transcripción del ADNc y la expresión en la membrana del canal hKv1.5, las células se barrían de la placa con rascadores de goma, procedimiento mediante el cual la mayoría de las células permanecen intactas. Tras dejar reposar la suspensión de células durante 1 h a temperatura ambiente, se comenzaban los experimentos electrofisiológicos (Vaquero y cols., 2007; Delpón y cols., 2008; Amorós y cols., 2010; Núñez y cols., 2013).

Para la selección de las células que habían incorporado los vectores, éstas se incubaban con una solución de microesferas de poliestireno unidas a anticuerpos anti-CD8 (Dynabeads M-450; Dynal, Oslo, Noruega). Los anticuerpos anti-CD8 se unen a las células que presentan en su membrana el antígeno de superficie CD8, células que, en la mayoría de los casos, también presentan el canal objeto de estudio. De este modo, para la realización de los experimentos, las células se seleccionaban mediante su observación al microscopio por la presencia en la membrana de las microesferas de poliestireno (Figura III.4).

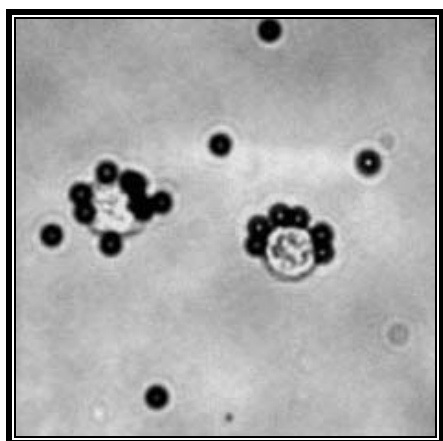


Figura III.4. Identificación de las células CHO que expresan el antígeno CD8 en su membrana. Células CHO transfectadas con el plásmido EBO-pcD leu2 identificadas mediante anticuerpos anti-CD8 unidos a microesferas de poliestireno (Dynabeads M-450).

2.3. Técnicas de registro en sistemas de expresión heterólogos

Para el registro de $I_{hKv1.5}$, se colocaba una alícuota de la suspensión de las células transfectadas en una cámara de 0.5 ml montada sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TS100; Nikon Co., Tokio, Japón). Para la obtención de los registros se utilizó un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). La generación de protocolos, la adquisición de datos y el análisis de los mismos fueron llevados a cabo mediante el uso del software PCLAMP 9.0 y de sus aplicaciones CLAMPEX y CLAMPFIT (Molecular Devices). Las micropipetas empleadas en los registros fueron obtenidas a partir de tubos capilares de borosilicato de 1.0 y 0.5 mm de diámetro exterior e interior, respectivamente (GD1; Narishige Co. Ltd., Tokio, Japón), utilizando un estirador horizontal de micropipetas programable (P-2000; Sutter Instruments Co., Novato, CA, EEUU). Posteriormente, las puntas de las micropipetas fueron pulidas en una microforja (MF-83; Narishige) hasta alcanzar el tamaño deseado. Para asegurar la calidad de la fijación del voltaje, la resistencia de las micropipetas utilizadas, una vez que se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era de 2-4 M Ω . Los artefactos de corriente capacitativa generados al aplicar pulsos simétricos de 10 mV fueron registrados a 50 kHz,

filtrados a 10 kHz y posteriormente utilizados para el cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula. Posteriormente se optimizaron la capacitancia y las resistencias en serie; en la mayor parte de los casos se obtuvo una compensación en torno al 80%. La resistencia de acceso no compensada y la capacitancia de las células *Ltk* fueron $2.4 \pm 0.2 \text{ M}\Omega$ y $12.1 \pm 0.7 \text{ pF}$, respectivamente, mientras que la amplitud máxima media de la $I_{hKv1.5}$ a +60 mV fue $1.6 \pm 0.1 \text{ nA}$ ($n=32$). Por tanto, en nuestras condiciones experimentales los errores de voltaje debidos a las resistencias en serie fueron mínimos ($<5 \text{ mV}$). Además la baja capacitancia permitió un rápido control en la fijación de voltaje. Las corrientes se filtraron a 2 kHz (frecuencia de muestreo=4 kHz) y se almacenaron en el disco duro de un ordenador para su posterior análisis.

Después de asentarse en el fondo de la cámara, las células fueron perfundidas con solución externa (ver composición más adelante) a una velocidad de flujo de $\approx 1 \text{ ml/min}$. Tras haber obtenido los registros de corriente macroscópica en situación control, se cambió la solución externa por otra que contenía la concentración deseada de los diferentes compuestos. Posteriormente, se dejó un periodo de equilibrio de 10 min antes de analizar los efectos de los mismos.

2.3.1. Registro de $I_{hKv1.5}$: Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la corriente macroscópica generada por los canales hKv1.5, la solución externa contenía (en mM): NaCl 136, KCl 4, CaCl_2 1.8, MgCl_2 1, HEPES 10 y glucosa 10 (ajustada a pH=7.4 con NaOH). Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH_2PO_4 10, MgATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5 y EGTA 5 (ajustada a pH=7.2 con KOH).

El protocolo para el registro de la $I_{hKv1.5}$ en las células transfectadas consistía en la aplicación de pulsos de 500 ms en incrementos de 10 mV entre -80 mV y +60 mV seguidos de un pulso de 500 ms a -40 mV. El potencial de fijación (*holding potential*) se mantuvo a -80 mV y el intervalo de tiempo entre los distintos protocolos de estimulación fue de al menos 30 s para evitar la acumulación de la inactivación y/o del bloqueo. Para la construcción de las relaciones corriente-voltaje (I-V) se representaba la amplitud de la corriente medida al final del pulso en función del potencial del pulso aplicado. A potenciales de membrana entre -80 y -40 mV, se obtuvo una “*corriente de fuga*” cuya amplitud aumentaba linealmente con la despolarización. Para los restantes potenciales de membrana, la amplitud de la corriente

generada por el canal se corregía sustrayendo el valor de la corriente de fuga calculado para cada potencial a partir de la extrapolación de la regresión lineal.

Las “*corrientes de cierre*” de los canales hKv1.5 previamente activados fueron registradas a -40 mV.

2.3.2. Análisis de los registros de $I_{hKv1.5}$

Las curvas de activación de $I_{hKv1.5}$ fueron obtenidas representando la amplitud del pico de las corrientes de cierre (*tail currents*) en función del pulso despolarizante previo y fueron ajustadas mediante una ecuación de Boltzmann:

$$y = \frac{A}{1 + e^{(V_h - V_m)/k}} \quad (1)$$

donde A es la amplitud, V_h el punto medio de activación (en mV), V_m el potencial del pulso y k representa el valor de la pendiente de la curva.

Para describir la cinética de inactivación de las corrientes durante la despolarización, así como la cinética de las corrientes de cierre durante la repolarización, se utilizó un análisis exponencial, ajustando la siguiente ecuación a los trazos de corriente:

$$y = C + A_1 e^{(-t/\tau_1)} + A_2 e^{(-t/\tau_2)} + \dots + A_n e^{(-t/\tau_n)} \quad (2)$$

donde τ_1 , τ_2 y τ_n son las constantes de tiempo del sistema, A_1 , A_2 y A_n son las amplitudes de cada uno de los componentes de la exponencial, y C es el valor basal. El procedimiento de ajuste utilizado fue un algoritmo no lineal de mínimos cuadrados (Gauss-Newton); los resultados obtenidos fueron representados en formato lineal y semilogarítmico. La bondad del ajuste fue estimada mediante el criterio de χ^2 , eliminándose aquellos ajustes en los que aparecían desviaciones sistemáticas no aleatorizadas.

La fracción de bloqueo (f) producido por cada compuesto fue definida como:

$$f = 1 - \frac{I_{\text{Compuesto}}}{I_{\text{Control}}} \quad (3)$$

La concentración eficaz 50 (CE_{50} , concentración necesaria para producir la mitad del efecto máximo) fue obtenida al ajustar la f obtenida en presencia de distintas concentraciones del compuesto $[C]$ a la ecuación:

$$f = \frac{1}{\left\{ 1 + \left(\frac{CE_{50}}{[C]} \right)^{n_H} \right\}} \quad (4)$$

El ajuste de la ecuación de Hill se hizo asumiendo un bloqueo máximo del 100% y fijando el coeficiente de Hill (n_H) a 1.

3. REGISTRO DE LA CORRIENTE I_{Kur} EN MIOCITOS AURICULARES HUMANOS

El estudio del que se obtuvieron las muestras de orejuelas auriculares humanas fue aprobado por el Comité de Investigación del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid (CNIC-13) y estaba en concordancia con los principios descritos en la Declaración de Helsinki. Las muestras de tejido auricular (orejuela derecha) se obtuvieron de pacientes en RS ($n=14$) y con FAC ($n=11$) que iban a ser sometidos a cirugías cardíacas que implicaban la utilización de una bomba extracorpórea. Antes de la operación, los pacientes recibieron y firmaron un consentimiento donde se les informaba de los fines experimentales a los que iba a ser destinada la muestra. Las características de dichos pacientes se resumen en la Tabla III.1.

3.1. Disociación de miocitos auriculares humanos

Para la disociación de las muestras se utilizó un protocolo de uso común en nuestro grupo de investigación (Gómez y cols., 2009; Amorós y cols., 2010; Caballero y cols., 2010a; Caballero y cols., 2010b; González de la Fuente y cols., 2013; Amorós y cols., 2013).

Las muestras se obtenían en el quirófano y se transportaban en solución *Tyrode* “cero calcio” (*Tyrode* 0 Ca^{2+} , de composición [en mM]: NaCl 100, KCl 10, KH_2PO_4 1.2, $MgSO_4$ 5, taurina 50, MOPS 5, glucosa 20), complementada con 2,3-butanodiona monoxima 30 mM (ajustado a pH=7.0 con NaOH). Una vez en el laboratorio en el que se realizaba la disociación, y tras la eliminación del tejido fibroso, la muestra se cortaba en pequeños trozos ($\approx 1\text{ mm}^3$) y se realizaban 4 lavados de 3 min cada uno en *Tyrode* 0 Ca^{2+} , en un baño a 37°C y con burbujeo de O_2 . Una vez lavados, los trozos se mantuvieron en la misma solución a la que se añadía collagenasa tipo I (254 U/ml; Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, EEUU) y proteasa tipo XXIV (0.5 mg/ml; Sigma). Pasados 15 min, se añadía Ca^{2+} (0.2 mM) y se mantenía en las mismas condiciones de temperatura y burbujeo durante otros 30 min. Transcurrido este tiempo, el tejido se filtraba y se resuspendía en *Tyrode* 0 Ca^{2+} en presencia de collagenasa, pero sin proteasa. Mientras la muestra se trataba sólo con collagenasa se

Material y Métodos

tomaban alícuotas cada 3 min para su observación al microscopio. Cuando tanto el número de miocitos como su morfología eran los idóneos (Figura III.5), se paraba la reacción enzimática.

	RS	FAC
Pacientes (<i>n</i>)	14	11
Edad (años)	65±2	69±3
M/F (<i>n</i>)	10/4	7/4
Cirugía		
Cirugía valvular (<i>n</i>)	6	5
<i>Bypass</i> (<i>n</i>)	2	2
Combinada (<i>n</i>)	6	4
Cardiopatía		
Valvular (<i>n</i>)	6	5
Isquémica (<i>n</i>)	2	2
Combinada (<i>n</i>)	6	4
Hipertensión (<i>n</i>)	6	5
Insuficiencia cardíaca	3	3
Diabetes mellitus (<i>n</i>)	1	2
Dislipidemia (<i>n</i>)	7	2
Diámetro AI (cm)	4.1±0.3	4.8±0.2*
Fracción de eyección (%)	54.0±2.4	45.3±3.0*
Clase Funcional NYHA		
I (<i>n</i>)	2	2
II (<i>n</i>)	8	3
III (<i>n</i>)	4	4
IV (<i>n</i>)	0	2
Creatinina (mg/dL)	1.0±0.1	0.85±0.1
Presión Sistólica Pulmonar (mm Hg)	56.3±4.9	47.5±5.2
Tratamiento		
Beta bloqueantes (<i>n</i>)	8	6
IECA/ARAII (<i>n</i>)	5	3
Estatinas (<i>n</i>)	7	3
Ácido acetilsalicílico (<i>n</i>)	4	4
Digoxina (<i>n</i>)	1	2
Antagonistas del calcio (<i>n</i>)	0	2
Diuréticos (<i>n</i>)	4	6
Espironolactona (<i>n</i>)	0	2
Clopidogrel (<i>n</i>)	0	1
Anticoagulantes orales (<i>n</i>)	1	7

Tabla III.1. Características de los pacientes. RS, ritmo sinusal; FA, fibrilación auricular; M, masculino; F, femenino; AI, aurícula izquierda; NYHA, New York Heart Association; IECA, inhibidores del enzima de conversión de angiotensina II; ARAII, antagonistas de los receptores tipo 1 de la angiotensina II. * P<0.05 vs. pacientes en RS.

A continuación, se resuspendía la muestra con un pipeteador durante 5 minutos en “solución de almacenamiento” (composición en mM: KCl 20, KH_2PO_4 10, glucosa 10, K-glutamato 70, ácido β -hidroxibutírico 10, taurina 10, EGTA 10 y albúmina 1 [ajustada a pH=7.4 con KOH]). Pasados esos 5 minutos se filtraba de nuevo la muestra y se volvía a resuspender en solución de almacenamiento. Por último, se añadían concentraciones crecientes de Ca^{2+} en tres pasos: el primero para obtener una concentración de 0.2 mM; tras 10 min se aumentaba la concentración hasta 0.3 mM; y en el tercer paso, tras otros 10 min, se alcanzaba una concentración final de 0.5 mM.

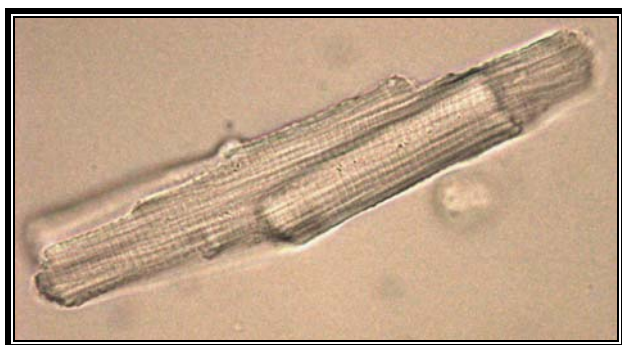


Figura III.5. Miocito auricular humano disociado enzimáticamente en nuestro laboratorio.

Los miocitos se dejaban reposar durante 1 h a 4°C hasta su posterior utilización para la obtención de los registros electrofisiológicos, siempre dentro de las siguientes 8 h.

3.2. Técnicas de registro de la I_{Kur} auricular humana

El registro de las corrientes nativas en miocitos auriculares humanos se realizaba de manera similar a como se ha explicado en el apartado 2.3 para el registro de corrientes en sistemas de expresión heterólogos. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente (22-24°C). Las micropipetas empleadas en estos registros fueron obtenidas como se ha descrito en el apartado 2.3. Su resistencia, una vez se rellenaban con la solución interna y se sumergían en la solución externa, era de 2-4 M Ω . El cálculo de la capacitancia, la resistencia de acceso y la impedancia de entrada a la célula se realizó como se ha descrito previamente para los sistemas de expresión heterólogos. En los miocitos auriculares humanos los valores de la amplitud media máxima de I_{Kur} a +50 mV, la resistencia de acceso no compensada y la capacitancia celular fueron 452.5 ± 87.7 pA, 3.6 ± 0.4 M Ω y 90.4 ± 13.8 pF ($n=5$), respectivamente. Por tanto, en estas condiciones los errores de voltaje debidos a las resistencias en serie fueron mínimos (<5 mV).

3.2.1. Registro de la I_{Kur} : Soluciones y protocolos experimentales

Para el registro de la I_{Kur} en miocitos auriculares humanos, la solución externa contenía (en mM): NaCl 120, KCl 20, $CaCl_2$ 1, $MgCl_2$ 1, HEPES 10 y glucosa 10 (ajustada a pH=7.4 con NaOH). A dicha solución se le añadía nifedipino (1 μ M) y atropina (0.1 μ M) para inhibir $I_{Ca,L}$ e $I_{K,ACh}$, respectivamente. Las micropipetas utilizadas para el registro se rellenaron con una solución interna cuya composición era (en mM): K-aspartato 80, KCl 42, KH_2PO_4 10, Mg-ATP 5, fosfocreatina 3, HEPES 5 y EGTA 5 (ajustada a pH=7.2 con KOH).

El protocolo para registrar la I_{Kur} auricular humana consistió en un prepulso de 250 ms a +50 mV (para inactivar la I_{to1}) seguido de pulsos de 250 ms en incrementos de 10 mV entre -90 mV y +50 mV. El potencial de fijación se mantenía a -80 mV y el tiempo transcurrido entre los distintos protocolos de estimulación era de 30 s. Las relaciones I-V fueron obtenidas representando la amplitud de la corriente medida al final del segundo pulso en función del potencial del pulso aplicado.

4. REGISTRO DE POTENCIALES DE ACCIÓN EN PREPARACIONES AURICULARES MULTICELULARES

4.1. Preparaciones auriculares multicelulares

Los PA cardíacos se registraron en aurículas izquierdas procedentes de ratones macho (cepa C57BL/6J), de \approx 12 semanas y de 25-30 g de peso (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EEUU). Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical para proceder a la extracción del corazón inmediatamente a través de una incisión en el tórax. A continuación, se colocaba éste en una placa Petri con solución *Tyrode* (en mM: NaCl 137, KCl 5.4, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 1.8, NaH_2PO_4 0.42, $NaHCO_3$ 11 y glucosa 10) previamente burbujeada con carbógeno (95% O_2 /5% CO_2), disecándose en ella las aurículas. Las aurículas se colocaban en una cámara de Lucita de 2 ml de capacidad y se fijaban, mediante alfileres entomológicos de acero inoxidable, sobre una superficie de Sylgard (Dow Corning, Midland, MI, EEUU). La preparación se perfundía de forma continua a una velocidad aproximada de 7 ml/min con una solución *Tyrode* oxigenada. Las soluciones se mantenían a una temperatura constante de $34 \pm 0.5^\circ C$ durante todo el experimento, controlándose la misma mediante una punta termosensible situada en el interior de la cámara y conectada a un lector de temperatura (Panlab, Barcelona, España). La preparación auricular se estimulaba mediante un electrodo

bipolar de platino colocado sobre su superficie y conectado a un estimulador programable (CS-220; Cibertec, Madrid, España). Los estímulos consistían en pulsos rectangulares de 1-2 ms de duración con una intensidad un 20% superior al potencial umbral, aplicados a una frecuencia de 3 Hz (Vaquero y cols., 2007; Gómez y cols., 2008; Chinchilla y cols., 2011).

4.2. Técnicas de registro de PA auriculares

Tras un período de estabilización de 1 h, se procedía al registro de los PA auriculares, utilizando para ello microelectrodos de vidrio rellenos con una solución de KCl 3 M y con una resistencia de punta de entre 8 y 15 M Ω . Los microelectrodos se conectaban mediante electrodos de Ag⁺/AgCl a un amplificador (mod. 750; WPI Instruments, Sarasota, FL, EEUU). La señal de salida se conectaba a un osciloscopio de memoria HM 205-3 (HAMEG Instruments GmbH, Mainhausen, Alemania) y a una interfaz analógico-digital MP150 (BIOPAC Systems, Goleta, CA, EEUU). Esta interfaz estaba conectada a un ordenador personal en el que se almacenaban los registros para el posterior análisis, mediante el uso del programa AcqKnowledge 3.9 (BIOPAC Systems). Los parámetros analizados fueron el potencial de reposo (PR, en mV), la amplitud del PA (APA, en mV) y la duración del PA auricular medida al 20%, 50% y 90% de la repolarización (DPA₂₀, DPA₅₀ y DPA₉₀, respectivamente, en ms).

5. COMPUESTOS Y SOLUCIONES

La anandamida (AEA), la meta-anandamida (MetAEA), el L- α -lisofosfatidilinositol (LPI), la estearoiletanolamida (SEA), el ácido araquidónico (AA), el ácido oléico (AO), el ácido esteárico (AS), el ácido palmítico (AP), la estaurosporina (inhibidor de la PKC) (Sigma Aldrich Co.), el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y la oleoiletanolamida (OEA) (Tocris Bioscience, MO, EEUU) se disolvieron en etanol, mientras que la palmitoiletanolamida (PEA) y el WIN55,212-2 (ambos de Sigma) se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). El rimonabant (RMB, antagonista CB1) (proporcionado amablemente por Sanofi-Aventis, Francia), el AM630 (antagonista CB2) y el AM281 (antagonista CB1) (Tocris Bioscience) se disolvieron también en DMSO. En algunos experimentos el EGTA de la solución interna fue sustituido por BAPTA 20 mM (Sigma). En todos los casos se hicieron inicialmente soluciones madre de 10 mM en el solvente adecuado y las diluciones posteriores se realizaron inmediatamente antes de cada experimento en solución externa o interna hasta obtener la

concentración final deseada. En experimentos preliminares se comprobó que las concentraciones finales de los solventes utilizados para la obtención de las soluciones madre de cada uno de los compuestos en las diferentes soluciones externas empleadas no modificaban la amplitud de la corriente estudiada.

6. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE COMPLEJIDAD

El grado de complejidad (C) de cada compuesto se calculó mediante la ecuación de Bertz/Hendrickson/Ihlenfeldt que tiene en cuenta tanto el tamaño de la molécula como la presencia y naturaleza de los diferentes grupos reactivos presentes en cada compuesto:

$$C = C_{\eta} + C_E \quad (5)$$

donde C_{η} es el término principal y mide la complejidad del esqueleto de la molécula y se calcula como:

$$C_{\eta} = 2\eta \log_2 \eta - \sum_i \eta_i \log_2 \eta_i \quad (6)$$

Cada valor de η_i se calcula como:

$$\eta_i = \frac{1}{2} (4 - h_i) (3 - h_i) \quad (7)$$

donde h es el número de hidrógenos del átomo i .

El valor de η para la molécula entera se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$\eta = \frac{1}{2} \sum_i (4 - h_i) (3 - h_i) - D - 3T \quad (8)$$

donde h_i es el número de hidrógenos del átomo i , D el número de dobles enlaces y T el número de triples enlaces.

C_E es el llamado término de simetría y su valor depende de la diversidad de elementos presentes en la molécula y se calcula como:

$$C_E = E \log_2 E - \sum_j E_j \log_2 E_j \quad (9)$$

siendo E el número total de átomos no hidrogenados y E_j el número de átomos del elemento j .

7. MEDIDAS DE ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO Y CON RESOLUCIÓN TEMPORAL

Una suspensión de células *Ltk*⁻ ($1-3 \times 10^6$ en 1 ml de solución externa) se incubó a 20°C durante 15 min en oscuridad con 2 μ M de la sonda aniónica fluorescente 2-carboxietil-1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (PA-DPH; Molecular Probes, Invitrogen, CA, EEUU) disuelta en DMSO. A continuación, para estudiar los efectos producidos por la AEA, el 2-AG, el LPI, la PEA, el AA y el AP sobre la anisotropía de fluorescencia, las células fueron incubadas con los

diferentes compuestos a la concentración de 1 μM junto con la sonda PA-DPH (2 μM) durante 20 y 120 min. Las medidas de anisotropía de fluorescencia en estado estacionario (r_{ss}) fueron realizadas a 20° C en un espectrofluorímetro contador de fotones ISS-PC1 con polarizadores Glan-Taylor. Las muestras se excitaron con luz linealmente polarizada vertical y se midieron las componentes de la intensidad de fluorescencia polarizada en las direcciones paralela (I_{par}) y perpendicular (I_{per}) al plano de polarización de la luz de excitación. Se usaron cubetas de 5x5 mm y anchos de banda de excitación y emisión de 2 nm y 10 nm, respectivamente ($\lambda_{exc} = 375 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$). La r_{ss} se define como:

$$r_{ss} = (I_{par} - I_{per} \times G) / (I_{par} + 2 \times G \times I_{per}) \quad (10)$$

donde G es un factor corrector debido a la diferente sensibilidad del canal de emisión a la luz polarizada horizontal y verticalmente. La intensidad total de fluorescencia y la r_{ss} , registrada en función del tiempo, alcanzaron valores estables a los 3-5 min y se mantuvieron constantes, al menos, durante 1 h.

En las medidas de intensidad de fluorescencia y de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal $[r(t)]$ la muestra es excitada mediante un corto pulso de luz y la respuesta fluorescente es detectada en función del tiempo. Estas medidas fueron llevadas a cabo usando una versión modificada de un sistema láser contador de fotones únicos correlacionados temporalmente utilizado previamente (Guizy y cols., 2008; Amorós y cols., 2010) y con un diodo láser PicoQuant 375 nm como fuente de excitación, con una resolución temporal de 12.2 ps por canal (Guizy y cols., 2008; Amorós y cols., 2010). La longitud de onda de emisión era de 450 nm (8 nm de ancho de banda). Además, se incluyó un filtro adicional de 418 nm para minimizar la dispersión de la señal de fluorescencia. Para la medida de los tiempos de vida media se registró la disminución de la intensidad total de fluorescencia de la muestra $[I_m(t)]$, con luz de excitación polarizada verticalmente y con el polarizador de emisión en posición de “ángulo mágico” ($m=54.7^\circ$). Dicha disminución se calculó mediante un ajuste de mínimos cuadrados no lineales realizado con un programa desarrollado para tal fin por GLOBALS Unlimited (Urbana, IL, EEUU) (Guizy y cols., 2008). La disminución progresiva de la $r(t)$ se determinó mediante el análisis simultáneo de los componentes de emisión $I_{par}(t)$ e $I_{per}(t)$ y asumiendo que la sonda tiene una rotación restringida y que por lo tanto su fluorescencia no se despolariza totalmente sino que decae hasta una anisotropía residual o límite (r_∞) de manera exponencial:

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \sum \beta_i \exp(-t/\phi_i) + r_\infty \quad (11)$$

donde ϕ_i son los tiempos de relajación correspondientes al movimiento rotacional restringido de la sonda en la membrana (Kinosita y cols., 1984; Mateo y cols., 1991; Guizy y cols., 2008;

Amorós y cols., 2010) y los factores preexponenciales β_i son las amplitudes normalizadas de cada movimiento. El valor de r_0 , que es la anisotropía característica del fluoróforo difenilhexatrieno (DPH) en ausencia de movimientos, fue determinado experimentalmente (0.390 ± 0.003) (Mateo y cols., 1991). La distribución de residuos ponderados fue empleada para juzgar la bondad del ajuste de la ecuación 11.

8. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES CB EN CÉLULAS DE CULTIVO Y EN MUESTRAS AURICULARES HUMANAS

8.1. Células *Ltk*⁻

El análisis de los niveles de ARNm de receptores CB en las células *Ltk*⁻ se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ARN de las células se extrajo con Reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) (Blázquez y cols., 2008). El ADN_c se obtuvo con Transcriptor (Roche, Basilea, Suiza). Los ensayos de PCR en tiempo real fueron realizados con 7900 HT-Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y las sondas se obtuvieron de Universal Probe Library Set (Roche). Cada valor se normalizó al ARN ribosómico 18S (ARNr 18S). Las sondas y los cebadores usados para el receptor CB1 de ratón fueron:

Sonda 79F/cebador: GGGCAAATTTTCCTTGTAGCA

Sonda 79R/cebador: GGCTAACGTGACTGAGAAA

Y para el receptor CB2 de ratón fueron:

Sonda 3F/cebador: CAGCTCTTGGGACCTACGTG

Sonda 3R/cebador: TGTCCCAGAAGACTGGGTGT

La expresión proteica de los receptores CB se analizó mediante Western Blot (WB). En los extractos de las células *Ltk*⁻, la solubilización de las proteínas se realizó usando un tampón de lisis (MgCl₂ 0.25 M, glicerol 10%, Nonidet-40 5%, HEPES 0.025 M, PMSF 0.1 mM, leupeptina 10 mg/ml, pepstatina A 10 mg/ml) durante 1 hora a 4 °C. Tras centrifugar los extractos se determinó la concentración de proteínas por el método del ácido bicínico (BCA, Pierce, IL, EEUU) y a continuación se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas PVDF, que se bloquearon con albúmina durante toda la noche y, posteriormente se incubaron con los anticuerpos anti-receptor CB₁ (1:1000; Affinity Bioreagents, Golden, CO, EEUU) y anti α -tubulina (1:4000; Sigma Aldrich). Más tarde, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa.

Las muestras se midieron por luminografía, empleando un kit de detección de quimioluminiscencia intensificada (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, EEUU). Los análisis densitométricos se llevaron a cabo usando el software Kodak Molecular Imaging 4.0 (Rochester, NY, EEUU) (Blázquez y cols., 2008; Gómez y cols., 2009).

8.2. Muestras auriculares humanas

El ARN se aisló a partir de muestras procedentes de orejuela derecha de 7 pacientes en RS y de 7 pacientes con FAC (Tabla III.1). Inmediatamente tras la extirpación quirúrgica, las muestras de tejido auricular se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C hasta su uso. Las muestras se homogeneizaron con un homogeneizador T-18 Basic ULTRA-TURRAX (IKA Laboratory Equipment, Staufen, Suiza) y el ARN total se extrajo con el kit RNeasy Protect (Qiagen, Valencia, CA, EEUU). A continuación se cuantificó el ARN por espectrofotometría y su calidad se verificó mediante el ratio 260/280 empleando un Nano-Drop 2000 (Thermo Scientific, MA, EE.UU)

8.2.1. RT-PCR

La PCR por transcripción inversa (RT-PCR) fue llevada a cabo utilizando el kit OneStep RT-PCR (Qiagen) y un termociclador *Mastercycler pro* (Eppendorf, Alemania).

Los cebadores (*primers*) directos (*forward, Fw*) e inversos (*reverse, Rv*) específicos para los receptores CB y para la PKC α , utilizada como control interno, se diseñaron a partir de las secuencias genéticas de cada receptor obtenidas de GenBank DNA sequences database y fueron sintetizados por Roche Diagnostics vía TIB-MOLBIOL (Alemania). Las temperaturas de fusión (T_m) para cada cebador específico aparecen reflejadas en la tabla III.2.

Los experimentos de RT-PCR se llevaron a cabo con 0.5 μ g de ARN total y se realizaron al menos tres veces para cada muestra. La RT-PCR se realizó en las siguientes condiciones:

- 1 ciclo de 30 minutos a 50°C para la retrotranscripción.
- 1 ciclo de 15 minutos a 95°C para la activación de la polimerasa.
- 40 ciclos compuestos cada uno por tres pasos: 1 minuto a 94°C para la desnaturalización del ADN, 1 minuto a la temperatura óptima de anillamiento (55°C) para el proceso de hibridación de los primers y 1 minuto a 72°C para la elongación.
- Y un último paso de extensión a 72°C durante 10 minutos.

Los productos de la RT-PCR fueron separados en geles de agarosa al 1.8% que contenían

0.5 ng/ml de bromuro de etidio. Los análisis densitométricos se realizaron utilizando el revelador Kodak Gel Logic 1500 y su programa de análisis (Eastman Kodak).

Receptor	Primer Fw 5'→3'	T _m (°C)	Primer Rv 3'→5'	T _m (°C)
CB1	AAGACCCTGGTCCTGATCCT	56.6	CGCAGGTCCTTACTCCTCAG	56.8
CB2	TAGACACGGACCCCCTTTTG	56.6	TTCTCCCAAGTCCCTCATTG	55.6
GPR55	AAGAACCCACAGACCAGGTG	57.2	CTCTGCCCAAGACACTCTCC	56.5
PKCα	CCTTAGGCGAGTGTGGTGA	56.5	CTTCTCTGGCTCCTTCCTGA	55.6

Tabla III.2. Secuencias de los primers usados en la RT-PCR.

8.2.2. RT-qPCR

Para poder cuantificar y comparar los niveles de expresión de los receptores CB en las muestras obtenidas de pacientes en RS y con FAc realizamos una RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR). Los cebadores específicos para los receptores fueron sintetizados por Roche Diagnostics vía TIB-MOLBIOL (Alemania) y la sonda fluorescente TaqMan® (con una sonda “reporter” en el extremo 5' y una sonda “quencher” en el extremo 3') y la ADN polimerasa se obtuvieron de Applied Biosystems. Como control interno se utilizó el gen constitutivo del ARNr18S. La RT-qPCR fue llevada a cabo en el servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC) utilizando el equipo 7900 HT-Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: un ciclo de 10 minutos a 95 °C para la activación de la polimerasa y 40 ciclos compuestos por dos pasos, 15 segundos a 95 °C (desnaturalización) y un minuto a 60 °C (hibridación y elongación).

El análisis de los resultados de la RT-qPCR se realizó con el software Real Time PCR SDS 2.2.2 (Applied Biosystems) y se usó el método de comparación de los valores del ciclo límite crítico (C_t, ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra se hace detectable por encima del fondo), que se define como:

$$2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (12)$$

siendo $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ muestra referencia - ΔC_t muestra estudio y $\Delta C_t = C_t$ muestras - C_t control interno. En nuestro caso las muestras estudio correspondían a las obtenidas de los pacientes con FAc y las muestras referencia a las procedentes de los pacientes en RS.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

En cada serie homogénea de experimentos se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el error estándar de la media (E.E.M.). Los datos que aparecen en las distintas tablas y representaciones gráficas de esta Tesis Doctoral se expresan como la media \pm EEM para un determinado número de experimentos (n).

Los datos obtenidos tras la exposición a los distintos fármacos fueron comparados con aquellos obtenidos en situación control. Las comparaciones realizadas a un único voltaje fueron llevadas a cabo mediante la prueba *t* de Student. Para analizar el bloqueo a distintos voltajes, a diferentes concentraciones de los fármacos ensayados y para comparar resultados entre más de dos grupos de experimentos se utilizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido de un test de Newman-Keuls. Para comparar curvas dosis-respuesta se empleó el test-F. Se consideraron como significativas aquellas diferencias para las que el valor de *P* resultó ser menor de 0.05.

Para la realización del análisis estadístico y la composición de las figuras que ilustran esta Tesis Doctoral se emplearon la aplicación CLAMPFIT del paquete informático PCLAMP (v9.0) (Molecular Devices), las aplicaciones Excel y PowerPoint del paquete informático Microsoft Office 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EEUU) y el programa Prism (v3.0 y v4.0) (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EEUU).

IV. RESULTADOS

Los resultados de la presente Tesis Doctoral se han dividido en dos apartados. En el primero de ellos se describen los efectos directos de diferentes endocannabinoides y etanolamidas con actividad cannabimimética sobre los canales Kv1.5 cardiacos humanos expresados de forma estable en células *Ltk*⁻. Se describen también los efectos de los ácidos grasos correspondientes a cada una de las etanolamidas sobre estos canales, lo cual nos permitió analizar la relación estructura/actividad de los compuestos estudiados. A continuación, en el segundo apartado, se describen los efectos producidos sobre la $I_{hKv1.5}$ tras la activación de los receptores CB₁ y GPR55.

1. CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DE LA $I_{hKv1.5}$

La Figura IV.1 muestra las principales características cinéticas y voltaje-dependientes de la $I_{hKv1.5}$, que coinciden con las descritas originalmente para esta corriente iónica (Snyders y cols., 1993; Delpón y cols., 1999; Vaquero y cols., 2007; Tamargo y cols., 2009). En el panel A de la Figura IV.1 se muestra una familia de trazos de corriente obtenidos en una célula *Ltk*⁻ que expresa de forma estable e inducible el gen que codifica el canal hKv1.5. Los trazos de $I_{hKv1.5}$ fueron registrados al aplicar pulsos despolarizantes de 500 ms de duración desde un potencial de fijación de -80 mV hasta potenciales comprendidos entre -80 mV y +60 mV en incrementos de 10 mV, seguidos de las corrientes de cierre generadas al repolarizar la membrana a -40 mV.

Al aplicar pulsos despolarizantes las corrientes hKv1.5 se activan rápidamente con una cinética sigmoidal. Como aproximación para describirla se utilizó una ecuación monoexponencial que permitió obtener una constante de tiempo de activación (τ_{act}) de 1.4 ± 0.1 ms cuando se aplicaban pulsos hasta +60 mV (n=50) (Figura IV.1B). Una vez alcanzado el pico máximo, la amplitud de la corriente hKv1.5 disminuía ligeramente ($15.8 \pm 1.1\%$ al final del pulso de 500 ms a +60 mV, n=50) (Figura IV.1C) a medida que se aplicaba el pulso despolarizante debido a la inactivación del canal. Al ajustar esta fase de caída a una función monoexponencial se obtuvo una constante de tiempo (τ_{inact}) de 247.2 ± 33.6 ms (n=50).

En los paneles A y D de la Figura IV.1 se muestran los trazos de corriente obtenidos al repolarizar la membrana a -40 mV (corrientes de cierre o de cola) tras aplicar pulsos de 500 ms de duración en escalones de 10 mV desde -80 hasta +60 mV. La amplitud de la corriente obtenida a -40 mV era proporcional al número de canales abiertos con el pulso previo, por lo que permitía analizar la dependencia de voltaje de la activación del canal. La corriente

registrada a -40 mV aumentaba cuanto más positivo era el pulso despolarizante previo, hasta llegar a saturación. El ajuste de una función biexponencial a las corrientes de cierre del canal permitió obtener unas constantes de tiempo rápida (τ_r) y lenta (τ_l) de 18.3 ± 0.8 ms y 65.6 ± 2.6 ms, respectivamente ($n=50$) (Figura IV.1D).

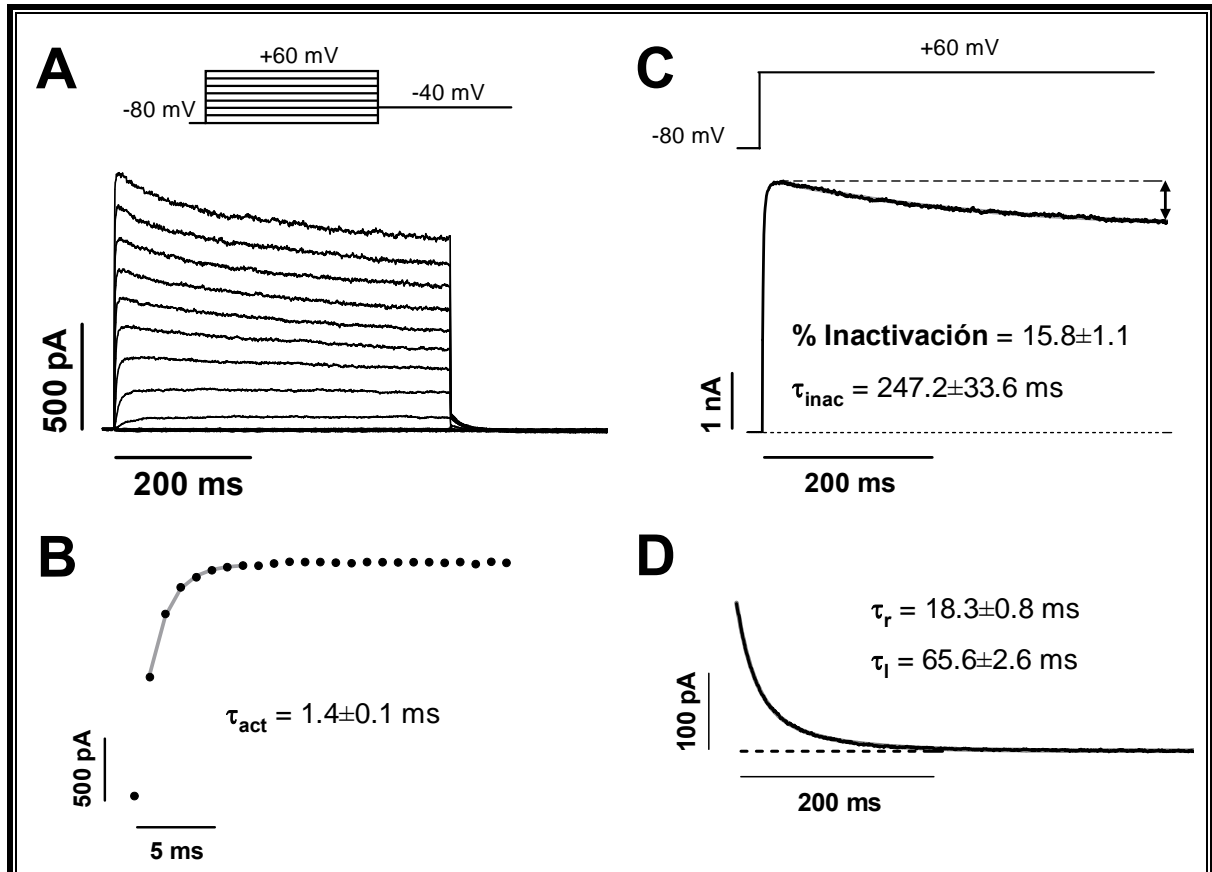


Figura IV.1. (A) Familia de trazos de corriente hKv1.5 registrados tras aplicar pulsos de 500 ms de duración entre -80 y +60 mV en incrementos de 10 mV, seguidos de las corrientes de cierre registradas al repolarizar a -40 mV. (B) Ajuste de una función monoexponencial (línea continua) a la fase de ascenso del trazo de corriente hKv1.5 a +60 mV para definir la cinética del proceso de activación de la corriente. (C) Ajuste monoexponencial del trazo de corriente hKv1.5 registrada tras aplicar pulsos de 500 ms de duración desde -80 mV hasta +60 mV. En este trazo se puede observar la ligera disminución de la corriente debido a su inactivación. (D) Ajuste de una función biexponencial a la corriente de cierre registrada al repolarizar la membrana a -40 mV.

2. EFECTOS DIRECTOS DE LOS ENDOCANNABINOIDES Y ANÁLOGOS DE CANNABINOIDES SOBRE LOS CANALES hKv1.5.

En este primer grupo de experimentos se han estudiado los efectos no mediados a través de receptor de diversos endocannabinoides tales como la AEA, el 2-AG o el LPI que en las células cardíacas se sintetizan endógenamente.

2.1. Efectos de la AEA y la MetAEA sobre los canales hKv1.5

Resultados

La AEA, que se sintetiza “a demanda” como todos los endocannabinoides, se degrada a etanolamina y AA por la acción de la enzima intracelular FAAH. Se ha descrito que el AA es capaz de interactuar con los canales hKv1.5 (Honoré y cols., 1994) y que además puede ser el punto de partida de formación de diversos compuestos con funciones biológicas múltiples (Guindon y Hohmann, 2008). Para comprobar que los efectos observados en presencia de AEA se debían a este compuesto y no a algún producto de su degradación se realizaron los mismos experimentos utilizando un análogo no hidrolizable, la MetAEA.

La Figura IV.2 muestra trazos de $I_{hKv1.5}$ registrados en células *Ltk* tras aplicar un pulso de 500 ms de duración a +60 mV desde un potencial de fijación de -80 mV, junto con las corrientes de cierre registradas al repolarizar la membrana a -40 mV. En la figura se muestran los trazos de corriente en situación control y los obtenidos en presencia de AEA (A) y de su análogo no hidrolizable MetAEA (B) a la concentración de 1 μ M.

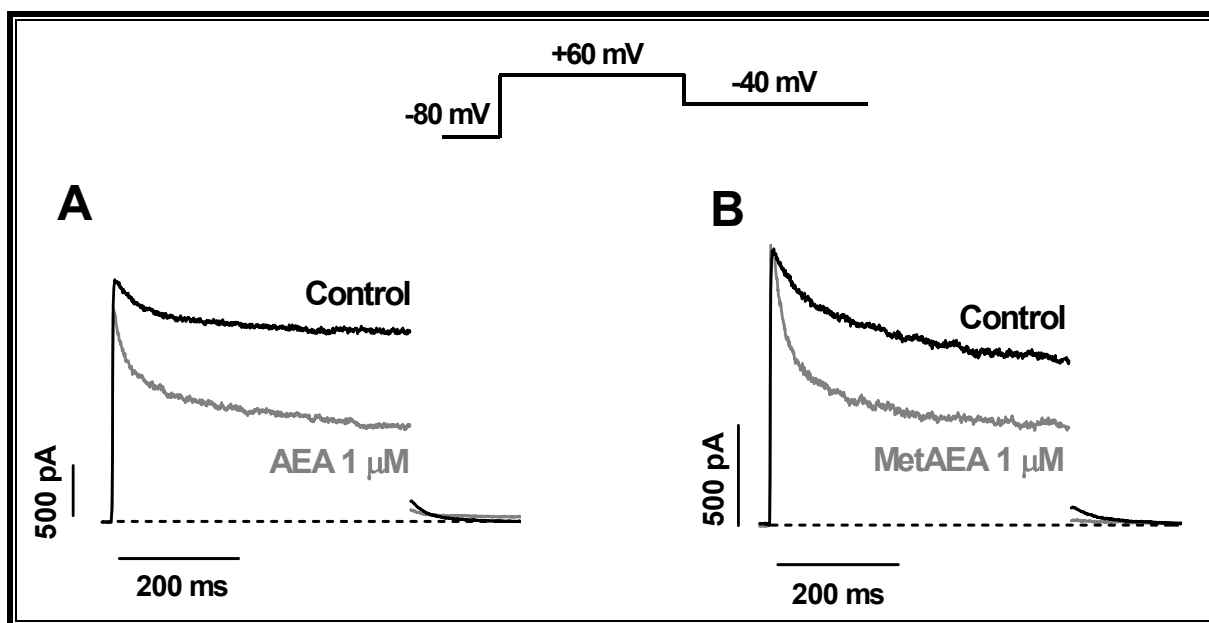


Figura IV.2. Efectos de la AEA y la MetAEA sobre la $I_{hKv1.5}$. Trazos de $I_{hKv1.5}$ registrados tras aplicar pulsos de 500 ms de duración desde -80 hasta +60 mV, junto con las corrientes de cierre registradas al repolarizar la membrana a -40 mV, en ausencia y presencia de AEA (A) y MetAEA (B) a la concentración de 1 μ M. Las líneas discontinuas representan el nivel de corriente cero.

La AEA redujo ligeramente la amplitud del pico de corriente, pero indujo una fase rápida de caída de la corriente ($\tau=19.4\pm3.7$ ms) sin modificar el proceso de inactivación ($\tau_{inac}=160\pm17$ ms), lo que disminuyó la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +60 mV en un $49.4\pm4.1\%$ ($P<0.05$ vs. control, $n=6$). Además, la AEA retrasó significativamente la cinética del proceso de deactivación aumentando los valores de las τ_r y τ_i desde 16.4 ± 2.9 y 98.1 ± 18.1 ms hasta 30.3 ± 6.5 y 173.9 ± 35.9 ms ($P<0.05$ vs. control, $n=6$), respectivamente.

Resultados

La MetAEA produjo efectos similares a los observados con la AEA, es decir, inhibió la corriente medida al final del pulso a +60 mV en un $42.7 \pm 4.3\%$ ($P < 0.05$ vs. control, $n=5$) y produjo también un retraso en el curso temporal de la deactivación (Tabla IV.1).

El curso temporal de aparición de la inhibición de la $I_{hKv1.5}$ producida por la AEA fue lento, alcanzándose el estado estable aproximadamente 10 minutos después de comenzar la perfusión del compuesto. Más aún, la inhibición no se revertía al perfundir las células con solución externa carente de fármaco (“lavado”). A modo de ejemplo en la Figura IV.3 se muestra la aparición y desaparición del bloqueo del canal hKv1.5 producido por la AEA a la concentración de 1 μ M. Es importante destacar que el efecto observado con la AEA no se debía a un “rundown” de la corriente, puesto que en ausencia del fármaco ésta permanecía estable durante más de 25 minutos tal y como aparece representado en círculos negros en la Figura IV.3.

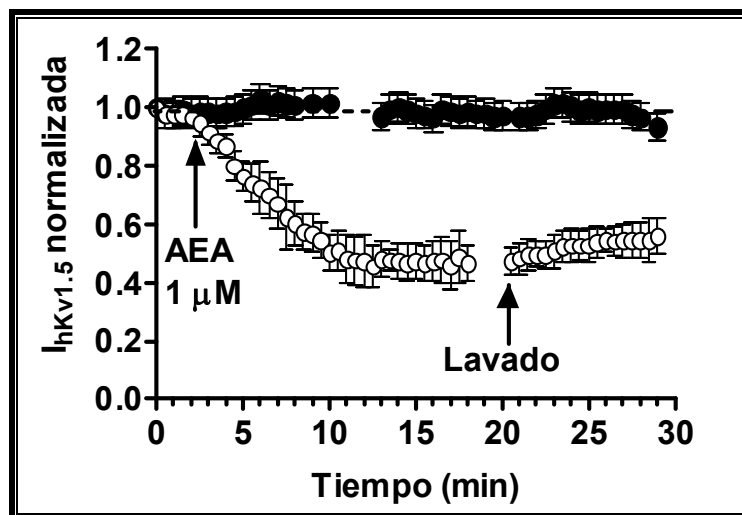


Figura IV.3. Curso temporal de aparición y desaparición del bloqueo de los canales hKv1.5 producido por la AEA. Los círculos negros representan la variación de la amplitud de la $I_{hKv1.5}$ normalizada en función del tiempo para observar la estabilidad de la corriente. Los círculos blancos representan la $I_{hKv1.5}$ normalizada durante los registros control, tras la perfusión de AEA a la concentración de 1 μ M y tras el lavado con solución externa carente de compuesto. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 5 experimentos.

A continuación se estudió la dependencia de voltaje de los efectos producidos por la AEA y la MetAEA. En la Figura IV.4A se muestran familias de trazos de $I_{hKv1.5}$ en ausencia y en presencia de la AEA (1 μ M), registradas tras aplicar el protocolo de pulsos que aparece en la parte superior. En las Figuras IV.4B y C se representan las curvas corriente-voltaje (I-V) obtenidas al representar la amplitud de la corriente medida al final del pulso de 500 ms en función del potencial de membrana en ausencia y en presencia de AEA y MetAEA, respectivamente, a la concentración de 1 μ M. La AEA y la MetAEA inhibieron la $I_{hKv1.5}$ de forma significativa a potenciales entre 0 y +60 mV ($P < 0.05$ vs. control, $n \geq 5$). Los cuadrados

representan la corriente relativa calculada como el cociente de la amplitud de la corriente en presencia y en ausencia del compuesto (I_c/I_{CON}). El bloqueo inducido por la AEA y la MetAEA aumentó marcadamente a potenciales de membrana comprendidos entre -20 y 0 mV, coincidiendo con el rango de potenciales de membrana a los cuales se produce la apertura del canal hKv1.5, lo que indica que la apertura del canal favorece la unión del compuesto. Sin embargo, a potenciales más positivos de 0 mV el bloqueo no se veía modificado de forma significativa.

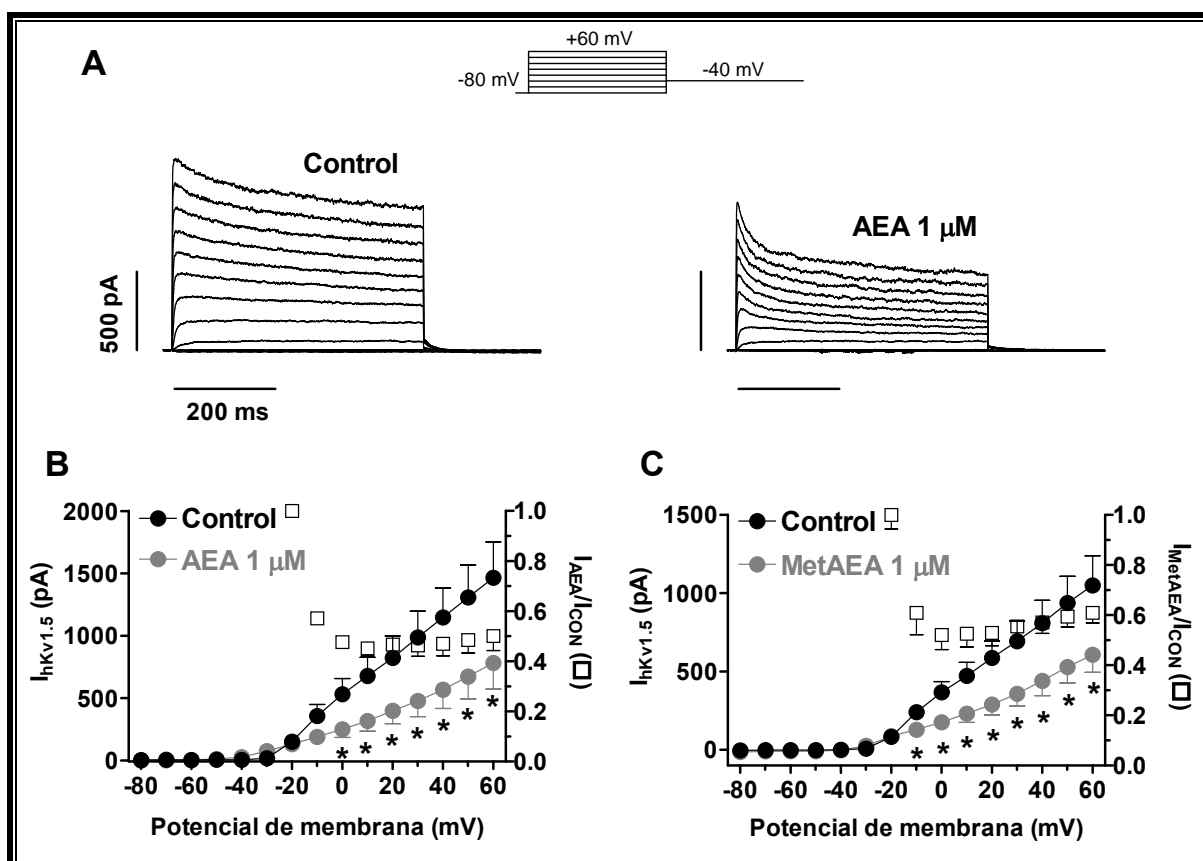


Figura IV.4. Efectos de la AEA y la MetAEA sobre la $I_{hKv1.5}$. (A) Familias de trazos de $I_{hKv1.5}$ obtenidos tras aplicar pulsos de 500 ms de duración desde -80 mV hasta potenciales entre -80 y $+60$ mV así como las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar la membrana a -40 mV en ausencia (panel de la izquierda) y en presencia (panel de la derecha) de AEA 1μ M. (B y C) Relaciones I-V de la $I_{hKv1.5}$ en situación control (círculos negros) y en presencia de AEA (B) y MetAEA (C) a la concentración de 1μ M (círculos grises). Los cuadrados representan la corriente relativa calculada como el cociente de la amplitud de la corriente en presencia y en ausencia de cada compuesto. * $P < 0.05$ frente a datos control. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 5 experimentos.

Para analizar en mayor profundidad la interacción de la AEA con los canales hKv1.5, se estudiaron sus efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación del canal. Al representar la amplitud del pico de las corrientes de cierre registradas a -40 mV en función del potencial del pulso previo, se obtienen las curvas de activación. La Figura IV.5 muestra las curvas de activación en ausencia y en presencia de AEA (A) y MetAEA (B), ambos a la concentración de 1μ M, junto con el ajuste de una función de Boltzmann (ecuación III.1) a los

Resultados

datos experimentales. Este ajuste permitió calcular los valores del punto medio (V_h) y de la pendiente (k) de la curva.

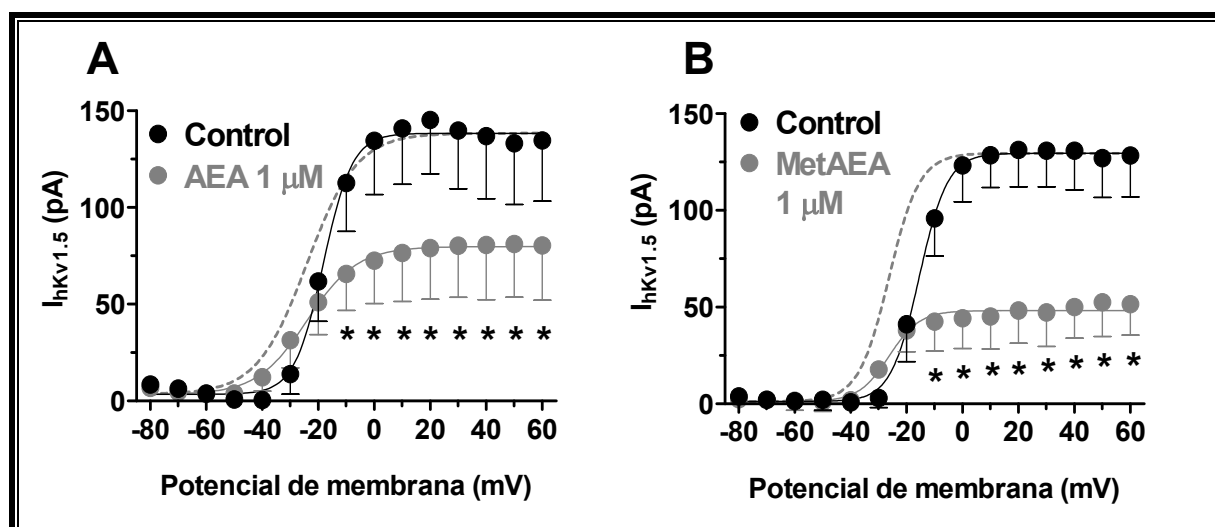


Figura IV.5. Efectos de la AEA y la MetAEA sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5. Curvas de activación de los canales hKv1.5 en ausencia y en presencia de AEA (A) y MetAEA (B) a la concentración de 1 μ M. Las líneas continuas representan el ajuste de una función de Boltzmann a los datos experimentales. La línea discontinua representa el ajuste de la curva de activación en presencia de cada compuesto normalizado a la amplitud del control. * $P < 0.05$ frente a datos control. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 5 experimentos.

La AEA (Figura IV.5A) y la MetAEA (Figura IV.5B) disminuyeron significativamente la amplitud de las corrientes de cierre y desplazaron significativamente la curva de activación hacia potenciales más negativos. De hecho, en condiciones control y en presencia de la AEA, el valor de V_h fue -17.5 ± 3.0 mV y -24.4 ± 4.6 mV, respectivamente ($P < 0.01$, $n = 6$, Tabla IV.1). Ninguno de los dos fármacos modificó el valor de k .

Dependencia de voltaje de la activación	V_h (mV)	k	Cinética de deactivación	τ_r (ms)	τ_l (ms)
Control	-17.5 ± 3.0	5.8 ± 1.1	Control	16.4 ± 2.9	98.1 ± 18.1
AEA	$-24.4 \pm 4.6^{**}$	6.2 ± 1.9	AEA	$30.3 \pm 6.5^{**}$	$173.9 \pm 35.9^*$
Control	-16.2 ± 2.3	4.0 ± 0.5	Control	20.6 ± 2.8	75.2 ± 11.7
MetAEA	$-28.1 \pm 2.4^{**}$	4.7 ± 0.3	MetAEA	$35.7 \pm 4.8^{**}$	$156.0 \pm 40.2^*$

Tabla IV.1. Efectos de la AEA y la MetAEA sobre la dependencia de voltaje de la activación de $I_{hKv1.5}$ y sobre la cinética de deactivación de $I_{hKv1.5}$. V_h y k son los valores de los puntos medios y las pendientes, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste de una ecuación de Boltzmann a las curvas de activación. τ_r y τ_l son las constantes de tiempo rápida y lenta obtenidas del ajuste de una ecuación biexponencial a los trazos de las corrientes de cierre. Los datos representan la media \pm E.E.M. de ≥ 5 experimentos. * y ** son $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente, frente a los valores control.

La Figura IV.6 muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas al representar la disminución de la $I_{hKv1.5}$ medida al final del pulso a +60 mV en función de las distintas concentraciones empleadas de cada compuesto. El ajuste de la ecuación de Hill (ecuación III.4) a los datos experimentales, fijando el coeficiente de Hill (n_H) a la unidad y asumiendo un bloqueo máximo del 100%, permitió obtener los valores de CE_{50} para la AEA y la MetAEA. Como se puede observar, la dependencia de concentración de los efectos producidos por la AEA y por la MetAEA fue muy similar, obteniéndose en ambos casos valores de CE_{50} en el rango micromolar bajo ($0.9 \pm 0.1 \mu M$ y $1.1 \pm 0.2 \mu M$ para la AEA y MetAEA, respectivamente). Estos resultados sugieren que los efectos producidos por la AEA son debidos al endocannabinoide y no son atribuibles al AA producido en su degradación.

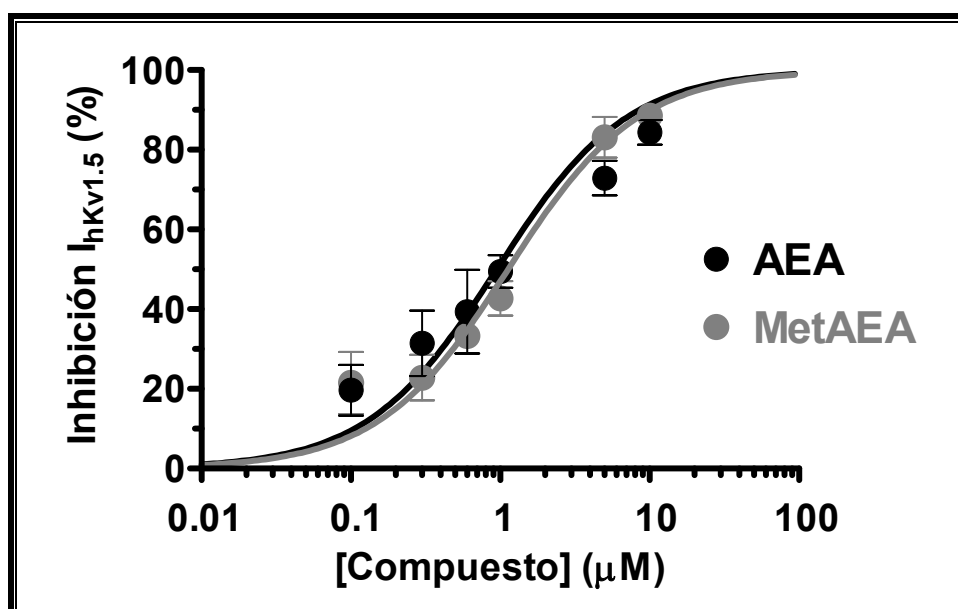


Figura IV.6. Curvas concentración-respuesta para la AEA y MetAEA. Representación de la reducción de la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +60 mV en función de las concentraciones de AEA (negro) y MetAEA (gris) estudiadas. Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales, fijando el n_H a la unidad y asumiendo un bloqueo máximo del 100%. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 5 experimentos.

2.1.1. Implicación de los receptores CB en los efectos de la AEA sobre la $I_{hKv1.5}$

Para descartar por completo la participación de los receptores CB en los efectos observados con la AEA, en el siguiente grupo de experimentos se analizaron los efectos de la AEA sobre los canales $hKv1.5$ en presencia del antagonista del receptor CB_1 Rimonabant (RMB, $K_i=1.8$ nM) y del antagonista del receptor CB_2 AM630 ($K_i=31.2$ nM).

En las Figuras IV.7A y B se muestran trazos de $I_{hKv1.5}$ registrados al aplicar pulsos de 500 ms de duración desde -80 hasta +60 mV en situación control, en presencia de RMB (A) y AM630 (B) solos o junto a la AEA ($1 \mu M$). La perfusión con RMB (500 nM) reducía la

Resultados

corriente al final del pulso a +60 mV en un $33.5 \pm 4.5\%$ ($n=4$). Es de destacar que en presencia del antagonista del receptor CB_1 , la AEA inhibía la $I_{hKv1.5}$ en un $48.3 \pm 2.6\%$ ($n=4$), una inhibición idéntica a la producida en ausencia de RMB ($P>0.05$). Asimismo, ni la dependencia de voltaje ni el tiempo del bloqueo de la AEA en presencia de RMB resultaron significativamente distintos a los obtenidos en ausencia del antagonista. Similares resultados se obtuvieron cuando se estudiaron los efectos de la AEA en presencia del AM630 (1 μ M). El antagonista del receptor CB_2 inhibía la $I_{hKv1.5}$ en un $23.5 \pm 2.6\%$, mientras que en su presencia la AEA 1 μ M inhibía la $I_{hKv1.5}$ en un $56.0 \pm 6.1\%$ ($n=4$), una reducción similar a la obtenida en ausencia del AM630 ($P>0.05$).

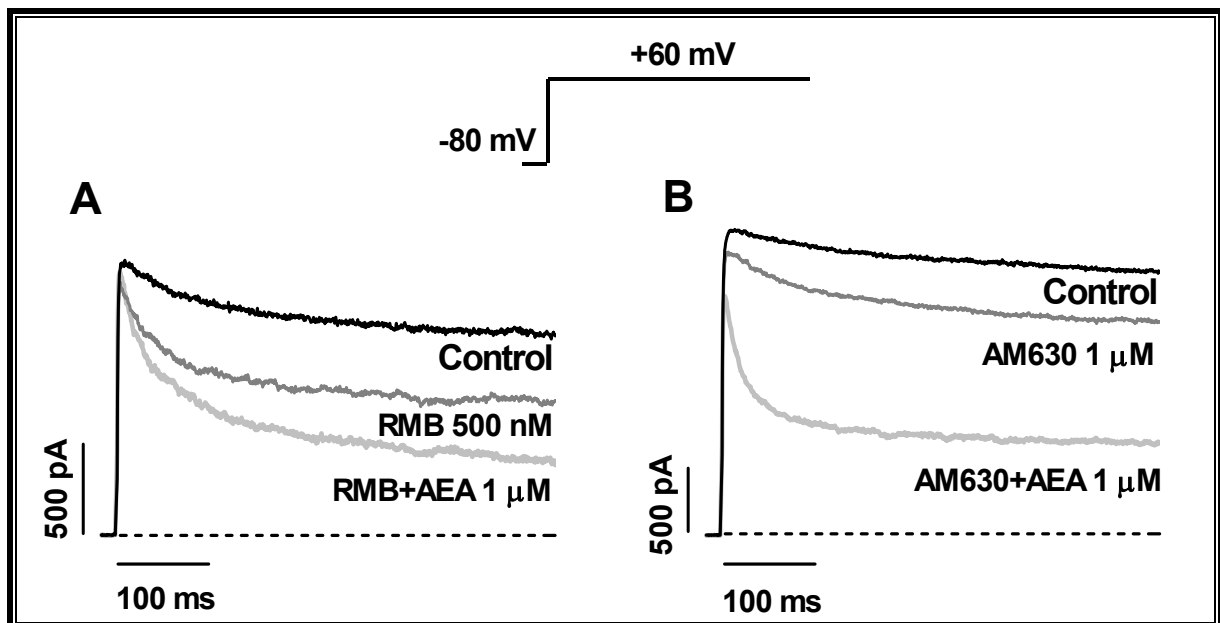


Figura IV.7. Efecto de la AEA sobre la $I_{hKv1.5}$ en presencia de antagonistas de receptores CB. (A) Trazos de $I_{hKv1.5}$ obtenidos tras aplicar un pulso desde -80 a +60 mV en situación control, en presencia del antagonista de receptores CB_1 RMB 500 nM y en presencia de RMB 500 nM y AEA 1 μ M. (B) Trazos de $I_{hKv1.5}$ obtenidos tras aplicar un pulso desde -80 a +60 mV en situación control, en presencia del antagonista de receptores CB_2 AM630 1 μ M solo o en combinación con AEA 1 μ M. Las líneas discontinuas representan el nivel cero de la corriente.

Por lo tanto podemos asumir que los efectos de la AEA sobre la $I_{hKv1.5}$ anteriormente observados, no se deben a la activación de los receptores CB por la AEA. Aun así, a continuación decidimos analizar la expresión de receptores CB_1 en las células *Ltk* mediante experimentos de Western blot. Como control positivo para CB_1 se utilizó un extracto de cuerpo estriado de cerebro de ratón, donde su expresión es muy abundante, y como control de carga se empleó la α -tubulina. En la Figura IV.8 se muestran ejemplos de los resultados obtenidos, y como se puede observar, las células *Ltk* donde se registra la $I_{hKv1.5}$, no expresan

de forma endógena los receptores CB₁. Más aún, en dichas células tampoco se detectó la presencia del ARNm de los receptores CB₁ o CB₂ por qPCR.

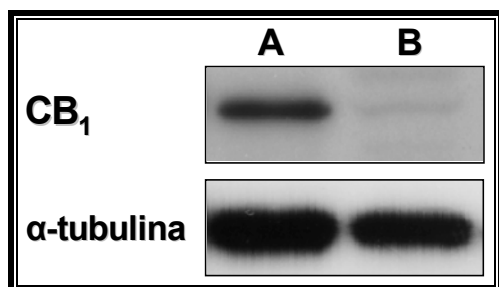


Figura IV.8. Expresión del receptor CB₁ en las células *Ltk*. Western blot realizado para determinar la expresión del receptor CB₁ en células *Ltk*. (A) Extracto de cuerpo estriado de cerebro de ratón usado como control positivo. (B) Células *Ltk*.

Este grupo de experimentos demostró que los efectos producidos por la AEA sobre los canales hKv1.5 son efectos directos debidos a la interacción del endocannabinoide con el canal y no mediados por su interacción con los receptores CB.

2.2. Efectos del 2-AG y del LPI sobre los canales hKv1.5

A continuación se estudiaron los efectos del 2-AG sobre los canales hKv1.5. Se ha propuesto que este compuesto podría ser el verdadero agonista endógeno de los receptores CB (Stella y cols., 1997; Sugiura y cols., 2006; Di Marzo y Macarrone, 2008) basándose en que: a) la actividad intrínseca del 2-AG por CB₁ y CB₂ es mayor que la de la AEA (Pertwee, 1999), b) las concentraciones plasmáticas de este endocannabinoide, en voluntarios sanos, son unas 200 veces mayores a los de la AEA (Sugiura y cols., 2002), c) se comporta como agonista total frente a CB₁ y CB₂ (Gonsiorek y cols., 2000; Savinainen y cols., 2001). Además, también se estudiaron los efectos del LPI por ser uno de los fosfolípidos endógenos propuesto como ligando para el receptor GPR55 (Oka y cols., 2007; Ryberg y cols., 2007; Mackie y cols., 2008).

En la Figura IV.9 se representan trazos de $I_{hKv1.5}$ obtenidos al aplicar el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura, en situación control y en presencia de 2-AG (A) y LPI (B), a la concentración de 1 μ M. El 2-AG producía efectos similares a los observados con la AEA y la MetAEA, de tal forma que reducía la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +60 mV en un $46.1 \pm 4.3\%$ ($P < 0.05$ vs. control, $n=7$; Figura IV.9A). Además, también retrasaba el curso temporal de la deactivación aumentando significativamente los valores de τ_r y τ_i obtenidos al ajustar los trazos de las corrientes de cierre a una función biexponencial (Tabla IV.1). Por su parte, el LPI disminuía la $I_{hKv1.5}$ en un $12.9 \pm 0.8\%$ ($P > 0.05$, $n=5$, Figura

IV.9B) y no modificaba de manera significativa las constantes de tiempo de la deactivación ($P>0.05$, $n=5$) (Tabla IV.2).

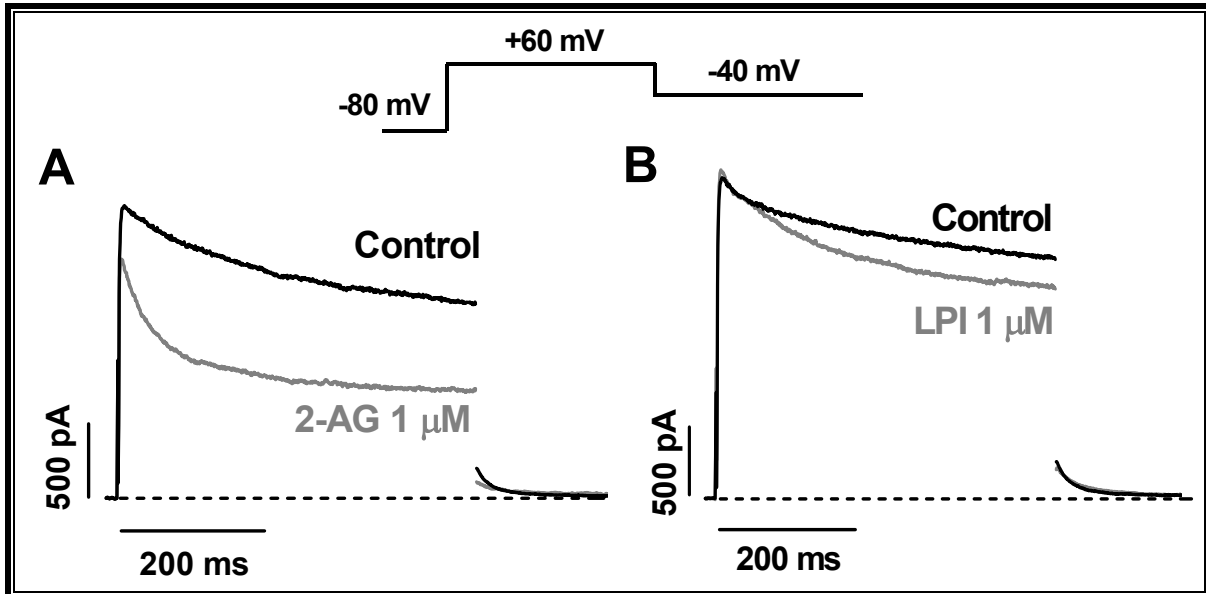


Figura IV.9. Efectos del 2-AG y del LPI sobre la $I_{hKv1.5}$. Trazos de corriente registrados tras aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta +60 mV junto con las corrientes de cierre registradas a -40 mV, en ausencia y presencia de 2-AG (A) y LPI (B) a la concentración de 1 μ M. Las líneas discontinuas representan el nivel cero de corriente.

Las Figuras IV.10A y B muestran las relaciones I-V en situación control y en presencia de 2-AG y LPI, respectivamente. El 2-AG reducía la $I_{hKv1.5}$ de forma significativa a potenciales entre 0 y +60 mV, mientras que el LPI no modificaba la $I_{hKv1.5}$ a ningún potencial.

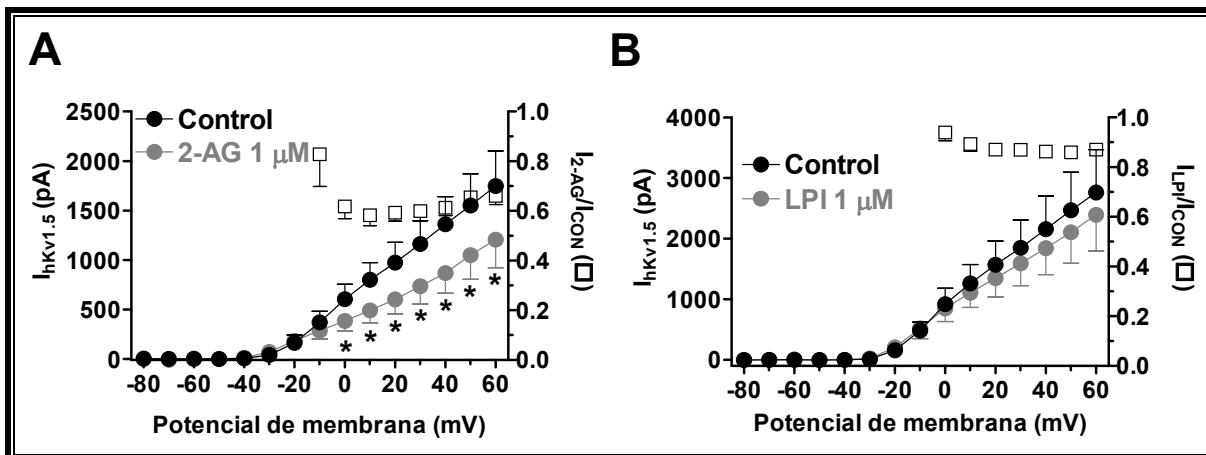


Figura IV.10. Efectos del 2-AG y del LPI sobre la $I_{hKv1.5}$. Relaciones I-V en situación control (círculos negros) y en presencia de 2-AG (A) y LPI (B) a la concentración de 1 μ M (círculos grises). Los cuadrados representan la corriente relativa calculada como el cociente de la amplitud de la corriente en presencia y en ausencia de cada compuesto. * $P<0.05$ frente a datos control. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 5 experimentos.

Como en el caso de la AEA y la MetAEA, el bloqueo inducido por el 2-AG aumentó marcadamente a potenciales de membrana comprendidos entre -20 y 0 mV (cuadrados

Resultados

blancos), coincidiendo con el rango de potenciales de membrana a los cuales se produce la apertura del canal hKv1.5, indicando de nuevo que la apertura del canal favorece la unión del compuesto. Sin embargo, a potenciales más positivos de 0 mV el bloqueo no se veía modificado de forma significativa. Como se puede observar en la Figura IV.10B, el LPI no inhibía significativamente la $I_{hKv1.5}$ a ninguno de los potenciales de membrana ensayados.

A continuación se estudiaron los efectos del 2-AG y del LPI sobre la dependencia de voltaje de la activación del canal. En la Figura IV.11 se muestran las curvas de activación de los canales hKv1.5 en ausencia y en presencia de 2-AG y de LPI, a la concentración de 1 μ M. El 2-AG disminuyó significativamente la amplitud de las corrientes de cierre a potenciales entre 0 y +60 mV y desplazó significativamente la curva de activación hacia potenciales más negativos, siendo los valores de V_h en situación control y en presencia de 2-AG de -14.6 ± 3.4 y -24.6 ± 4.8 mV, respectivamente ($n=7$, $P<0.01$, Tabla IV.2). Sin embargo, el valor de k no se vio modificado. Por el contrario, el LPI no modificó significativamente la amplitud de las corrientes de cierre ni tuvo efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación del canal.

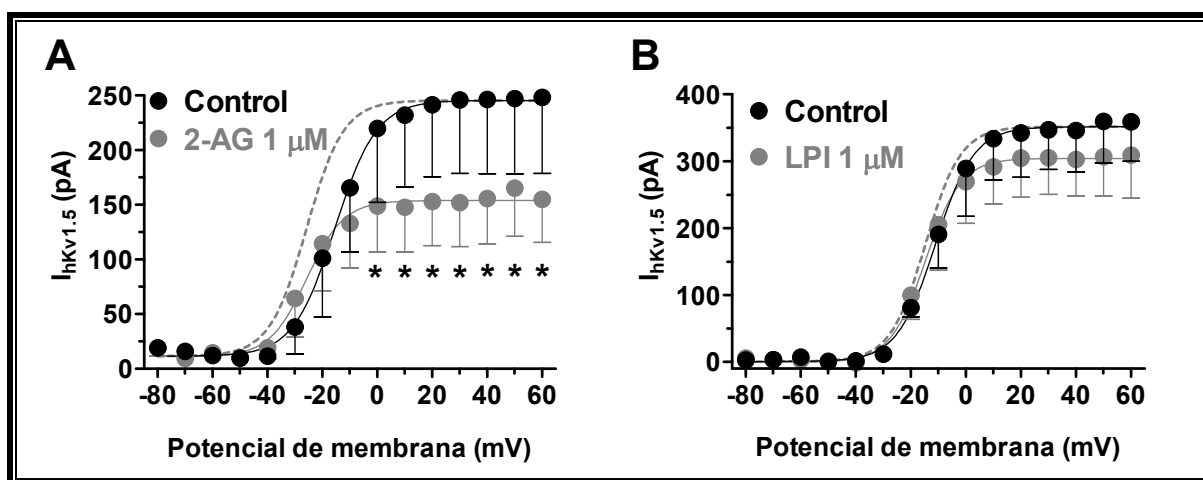


Figura IV.11. Efectos del 2-AG y del LPI sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5. Curvas de activación de los canales en situación control y en presencia de 2-AG (A) y LPI (B) a la concentración de 1 μ M. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. Las líneas discontinuas representan el ajuste de la curva en presencia de cada compuesto normalizadas respecto a la amplitud control. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de 5 experimentos. * $P < 0.05$ vs. control.

La Figura IV.12 muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas al representar la inhibición de la $I_{hKv1.5}$ a +60 mV en función de las distintas concentraciones estudiadas de cada compuesto. Del ajuste de la ecuación de Hill a los datos se obtuvo el valor de CE_{50} para el 2-AG (2.5 ± 0.2 μ M). Sin embargo en el caso del LPI no pudo ajustarse una ecuación de Hill debido a que el bloqueo obtenido con la máxima concentración que se pudo estudiar (10 μ M) estaba por debajo del 20%.

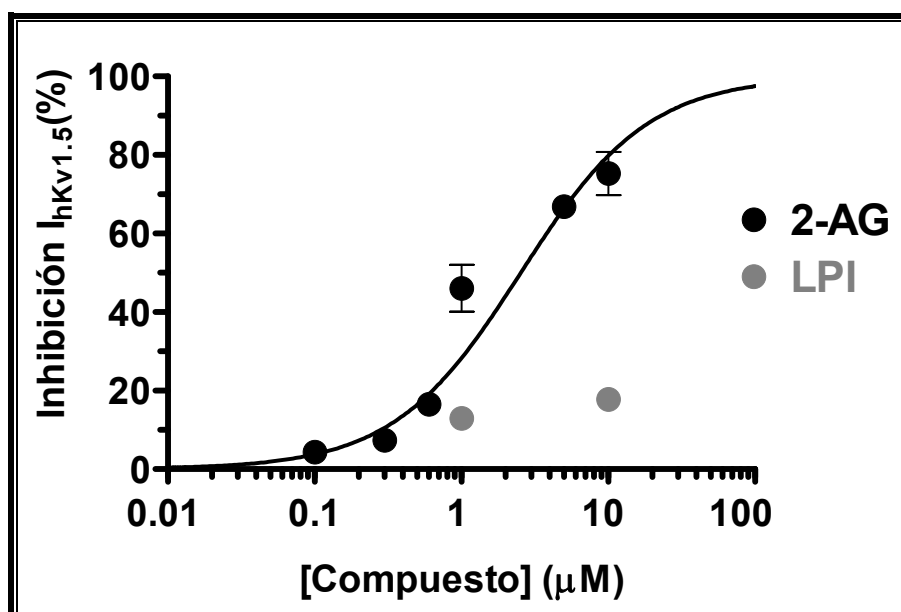


Figura IV.12. Curvas concentración-respuesta para el 2-AG y el LPI. Reducción de la amplitud de la $I_{hKv1.5}$ a +60 mV en función de la concentración de 2-AG (negro) y de LPI (gris). La línea continua representa el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales, fijando el n_H a la unidad y asumiendo un bloqueo máximo del 100%. Cada punto representa la media±E.E.M. de ≥ 4 experimentos.

Dependencia de voltaje de la activación	V_h (mV)	k	Cinética de deactivación	τ_r (ms)	τ_l (ms)
Control	-14.6±3.4	5.9±0.6	Control	17.6±3.0	77.0±18.2
2-AG	-24.6±4.8**	5.7±0.8	2-AG	32.6±5.8**	163.6±45.1*
Control	-13.8±0.9	7.3±1.0	Control	17.2±0.3	73.4±11.6
LPI	-17.1±0.1	6.2±0.5	LPI	19.1±1.3	90.5±3.4

Tabla IV.2. Efectos del 2-AG y el LPI sobre la dependencia de voltaje de la activación de $I_{hKv1.5}$ y sobre la cinética de deactivación de $I_{hKv1.5}$. V_h y k son los valores de los puntos medios y las pendientes, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste de una ecuación de Boltzmann a las curvas de activación. τ_r y τ_l son las constantes de tiempo rápida y lenta obtenidas del ajuste de una ecuación biexponencial a los trazos de las corrientes de cierre. Los datos representan la media±E.E.M. de ≥ 4 experimentos. * y ** son $P<0.05$ y $P<0.01$, respectivamente, frente a los valores control.

2.3. Efectos de la PEA, la SEA y la OEA sobre los canales $hKv1.5$

En este grupo de experimentos se estudiaron los efectos de varias etanolamidas, como la PEA, la SEA y la OEA, que se han propuesto que actuarían como análogos de endocannabinoides o compuestos cannabimiméticos. Estos compuestos presentan actividades biológicas similares a los endocannabinoides pero no se unen a los receptores CB (Di Marzo y cols., 2001; Smart y cols., 2002; Maccarrone y cols., 2002; Hansen 2010).

En la Figura IV.13A-C se representan trazos de $I_{hKv1.5}$ obtenidos al aplicar pulsos de 500 ms de duración desde un potencial de fijación de -80 mV hasta +60 mV junto con las corrientes de cierre registradas al repolarizar la membrana a -40 mV, en situación control y en

Resultados

presencia de PEA, SEA y OEA, a la concentración de 1 μM . Como se puede observar, la PEA (Figura IV.13A) y la SEA (Figura IV.13B) no modificaban ni la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +60 mV ($3.6 \pm 1.2\%$ y $4.0 \pm 1.2\%$ de inhibición, respectivamente) ni el curso temporal de la deactivación ($n=5$, $P>0.05$ frente a control, Tabla IV.3). Por el contrario, la OEA (Figura IV.13C) sí disminuía de forma significativa la $I_{hKv1.5}$ ($29.8 \pm 4.7\%$ a +60 mV, $n=4$) y, además también retrasaba el curso temporal de la deactivación ($n=4$, $P<0.05$ frente control, Tabla IV.3).

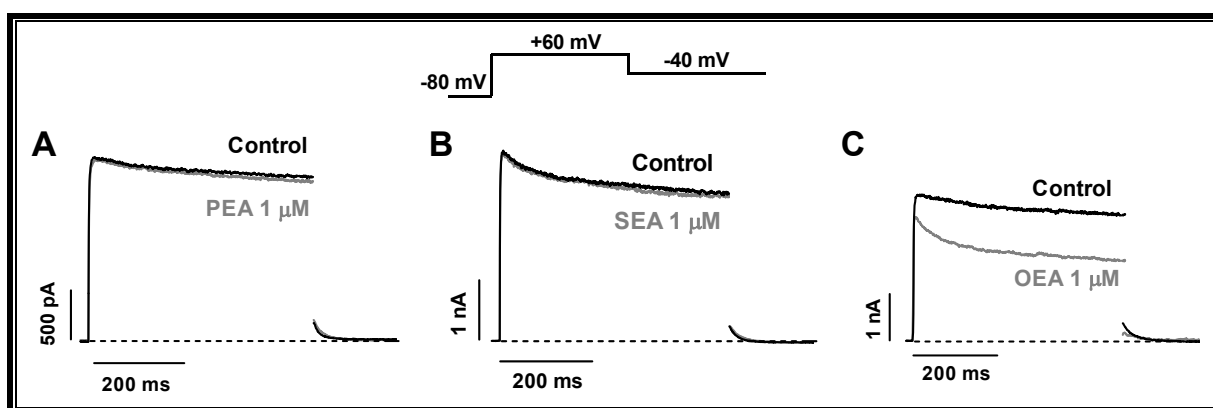


Figura IV.13. Efectos de la PEA, SEA y OEA sobre la $I_{hKv1.5}$. (A-C) Trazos de corriente registrados tras aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta +60 mV en ausencia y presencia de PEA (A), SEA (B) y OEA (C) a la concentración de 1 μM . Las líneas discontinuas representan el nivel de corriente cero

La representación de las relaciones I-V en ausencia y en presencia de las tres etanolamidas (Figura IV.14A-C) demostró que la OEA reducía significativamente la $I_{hKv1.5}$ a potenciales entre 0 y +60 mV (Figura IV.14C) y además el bloqueo que inducía aumentaba marcadamente a potenciales comprendidos entre -20 y 0 mV (potenciales a los que se produce la apertura del canal). Además, la OEA disminuía la amplitud de las corrientes de cierre a potenciales entre 0 y +60 mV y desplazaba la dependencia de voltaje de la activación hacia potenciales más negativos de forma significativa y sin modificar los valores de k (Figura IV.14F) (Tabla IV.3).

Por el contrario, ni la PEA (Figura IV.14A) ni la SEA (B) reducían significativamente la $I_{hKv1.5}$ a ninguno de los potenciales ensayados ni tampoco modificaban la dependencia de voltaje de la activación (Figura IV.14D y E) (Tabla IV.3).

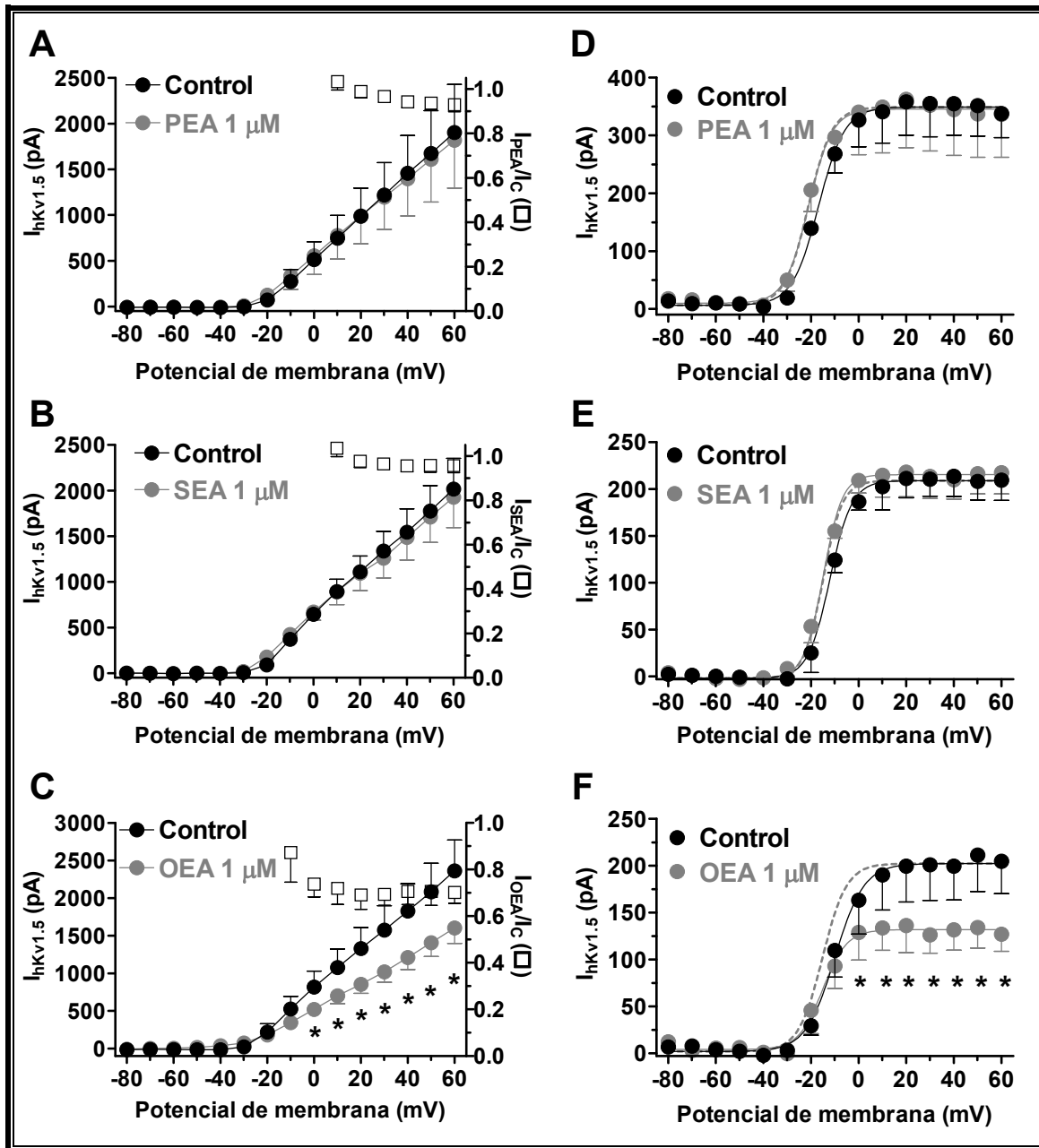


Figura IV.14. Efectos de las etanolamidas sobre la $I_{hKv1.5}$. (A-C) Relaciones I-V en situación control (círculos negros) y en presencia de PEA (A), SEA (B) y OEA (C) a la concentración de 1 μ M (círculos grises). Los cuadrados representan la corriente relativa calculada como el cociente de la amplitud de la corriente en presencia y en ausencia de cada compuesto. (D-F) Curvas de activación de los canales hKv1.5 en ausencia y en presencia de PEA (D), SEA (E) y OEA (F) a la concentración de 1 μ M. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. Las líneas discontinuas representan el ajuste de la curva en presencia de cada compuesto normalizadas respecto a la amplitud control. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 4 experimentos. *P < 0.05 frente a datos control.

La Figura IV.15 muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas al representar la disminución de la $I_{hKv1.5}$ medida al final del pulso a +60 mV en función de las distintas concentraciones empleadas de cada etanolamida. Del ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales se obtuvieron los valores de CE_{50} para la SEA ($28.0 \pm 12.0 \mu$ M) y para la OEA ($5.8 \pm 1.2 \mu$ M), siendo esta última más potente para bloquear los canales hKv1.5.

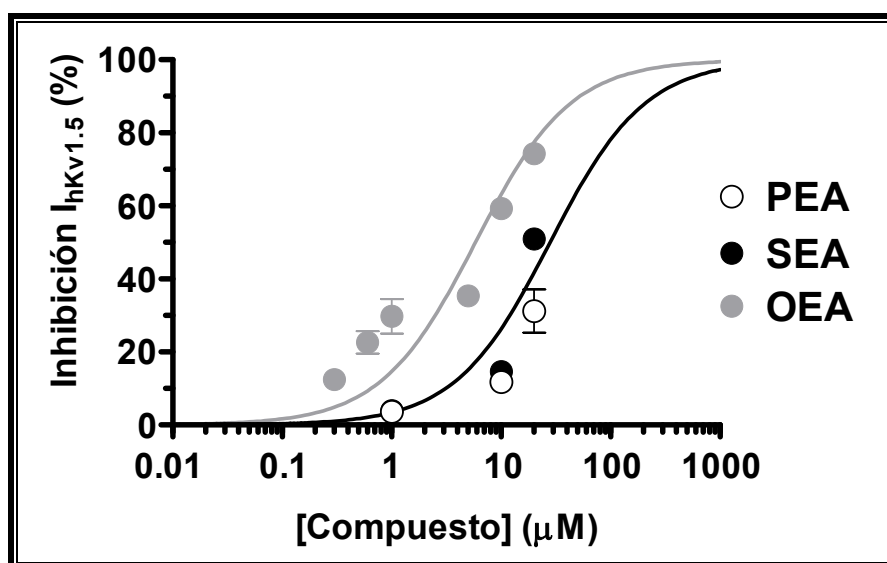


Figura IV.15. Curvas concentración-respuesta para las etanolamidas. Representación de la reducción de la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +60 mV en función de las concentraciones de PEA (círculos blancos), SEA (círculos negros) y OEA (círculos grises) estudiadas. Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales, fijando el n_H a la unidad y asumiendo un bloqueo máximo del 100%. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 4 experimentos.

Sin embargo, al igual que en el caso del LPI, para la PEA no se pudo obtener el valor de su CE_{50} mediante la ecuación de Hill debido a que la máxima concentración que pudo estudiarse (20 μ M) apenas producía un 30% de bloqueo.

Dependencia de voltaje de la activación	V_h (mV)	k	Cinética de deactivación	τ_r (ms)	τ_l (ms)
Control	-17.2 \pm 3.5	7.1 \pm 0.8	Control	14.1 \pm 1.3	144.9 \pm 7.4
PEA	-21.5 \pm 4.4	6.1 \pm 0.7	PEA	12.6 \pm 2.1	141.6 \pm 9.0
Control	-12.1 \pm 2.8	4.6 \pm 0.2	Control	18.0 \pm 2.2	88.1 \pm 11.2
SEA	-14.9 \pm 4.1	3.9 \pm 0.3	SEA	21.2 \pm 1.9	78.7 \pm 5.7
Control	-12.0 \pm 3.5	6.2 \pm 0.6	Control	12.8 \pm 2.1	80.3 \pm 13.4
OEA	-19.8 \pm 5.4*	4.5 \pm 0.3	OEA	17.3 \pm 1.5*	98.1 \pm 10.6

Tabla IV.3. Efectos de las etanolamidas sobre la dependencia de voltaje de la activación de $I_{hKv1.5}$ y sobre la cinética de deactivación de $I_{hKv1.5}$. V_h y k son los valores de los puntos medios y las pendientes, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste de una ecuación de Boltzmann a las curvas de activación. τ_r y τ_l son las constantes de tiempo rápida y lenta de la cinética de deactivación. Los datos representan la media \pm E.E.M. de ≥ 4 experimentos. * $P < 0.05$ frente a los valores control.

2.4. Efectos de los ácidos grasos AP, AS, AO y AA sobre los canales hKv1.5

Tanto la AEA como el resto de etanolamidas se sintetizan de forma endógena a partir de sus ácidos grasos correspondientes (Sun y cols., 2004; Muccioli 2010). Por lo tanto y para profundizar más en la posible relación estructura-actividad, en el siguiente grupo de

experimentos se estudiaron los efectos de los ácidos grasos a partir de los cuales se sintetizan las etanolamidas anteriormente estudiadas: el AP (16:0), el AS (18:0), el AO (18:1) y el AA (20:4) sobre las características electrofisiológicas de la $I_{hKv1.5}$.

En la Figura IV.16 se representan trazos de $I_{hKv1.5}$ obtenidos con el protocolo que se muestra en la parte superior de la figura, tanto en situación control como en presencia de los distintos ácidos grasos. Mientras que el AP producía una discreta inhibición de la corriente al final del pulso a +60 mV ($12.8 \pm 2.9\%$, $n=4$, $P>0.05$) sin afectar a la cinética de deactivación (Tabla IV.3), el AS, el AO y el AA inhibían la $I_{hKv1.5}$ al final del pulso a +60 mV en un $31.9 \pm 2.8\%$, 75.7 ± 1.6 y $32.0 \pm 2.1\%$, respectivamente ($n \geq 4$, $P<0.05$), y retrasaban el curso temporal de la deactivación (Tabla IV.3).

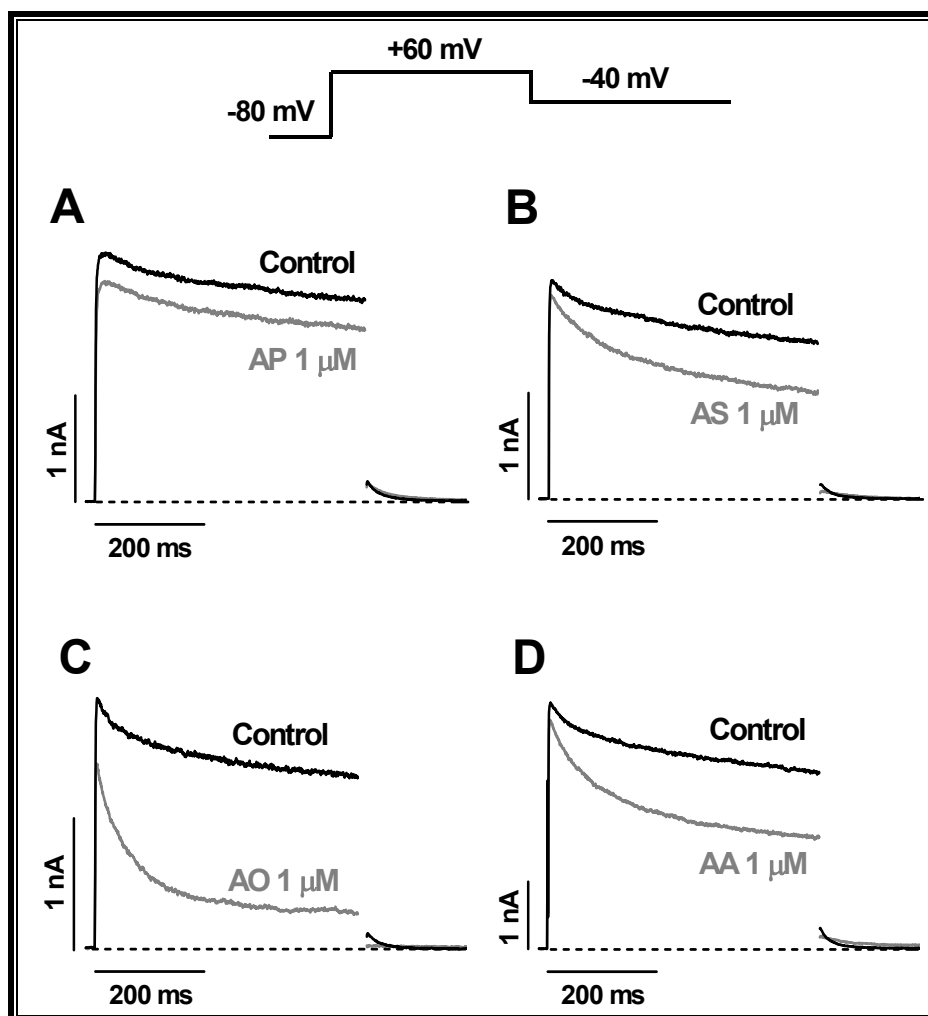


Figura IV.16. Efectos de los ácidos grasos sobre la $I_{hKv1.5}$. Trazos de corriente registrados tras aplicar pulsos de 500 ms desde -80 hasta +60 mV en ausencia y presencia de AP (A), AS (B), AO (C) y AA (D) a la concentración de 1 μ M. Las líneas discontinuas representan el nivel cero de corriente.

La Figura IV.17A-D muestra las relaciones I-V en situación control y en presencia de los ácidos grasos a la concentración de 1 μ M.

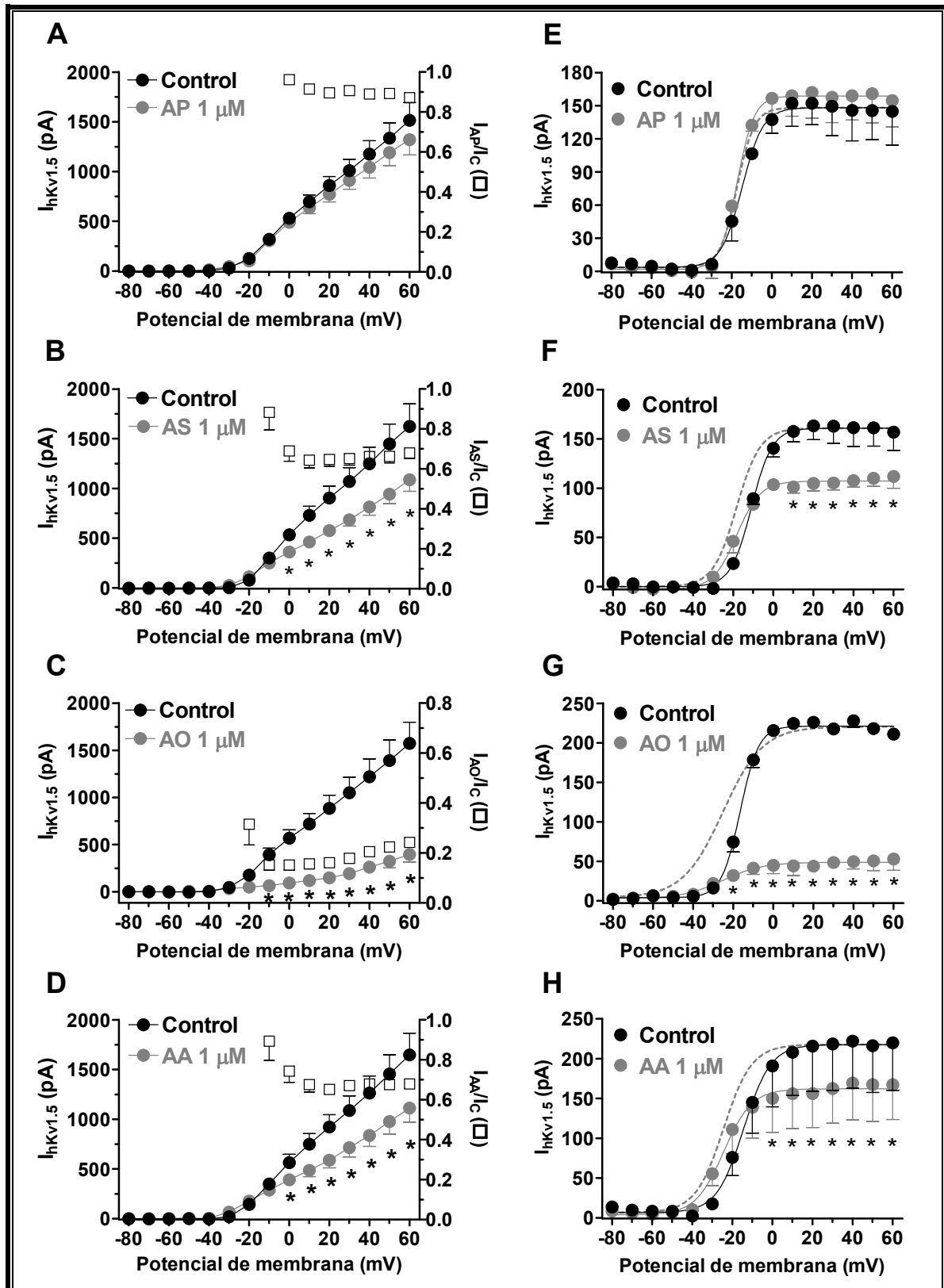


Figura IV.17. Efectos de los ácidos grasos sobre la $I_{hKv1.5}$. (A-D) Relaciones I-V en situación control y en presencia de AP (A), AS (B), AO (C) y AA (D) a la concentración de 1 μM. Los cuadrados representan la corriente relativa. (E-H) Curvas de activación de los canales hKv1.5 en ausencia y en presencia de AP (E), AS (F), AO (G) y AA (H) a la concentración de 1 μM. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. Las líneas discontinuas representan el ajuste de la curva en presencia de cada compuesto normalizadas respecto a la amplitud control. Cada punto representa la media±E.E.M. de ≥4 experimentos. *P < 0.05 frente a valores control.

Como se puede observar el AS, el AO y el AA reducían significativamente la $I_{hKv1.5}$ a todos los potenciales a los que la corriente está activada. Más aun, dicho bloqueo aumentaba marcadamente a potenciales comprendidos entre -20 y 0 mV, alcanzando valores a 0 mV de un $31.0 \pm 5.1\%$, un $84.7 \pm 2.2\%$ y un $26.3 \pm 10.7\%$ para el AS, el AO y el AA, respectivamente. A potenciales más positivos de 0 mV, el bloqueo permaneció constante ($P > 0.05$ frente al bloqueo producido a 0 mV). Por el contrario el AP no modificó la $I_{hKv1.5}$ a ninguno de los potenciales ensayados.

Al analizar los efectos que producían los ácidos grasos sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5 (Figura IV.17E-H) se puede apreciar cómo todos aquellos que inhibían significativamente las corrientes de cierre (AS, AO y AA) también desplazaban la curva de activación hacia potenciales más negativos sin modificar el valor de k (Tabla IV.4). Por su parte, el AP ni reducía la amplitud de las corrientes de cierre ni modificaba la dependencia de voltaje de la activación.

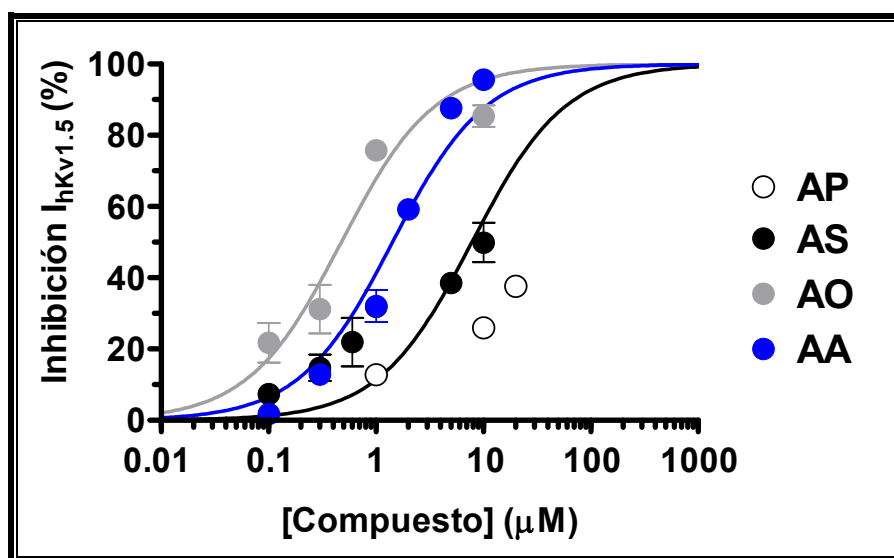


Figura IV.18. Curvas concentración-respuesta para los ácidos grasos. Representación de la reducción de la amplitud de la corriente a +60 mV en función de las distintas concentraciones de AP (círculos blancos), AS (círculos negros), AO (círculos grises) y AA (círculos azules) estudiadas. Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales, fijando el n_H a la unidad y asumiendo un bloqueo máximo del 100%. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 4 experimentos.

En la Figura IV.18 se representa la inhibición de $I_{hKv1.5}$ a +60 mV producida por las diferentes concentraciones de los distintos ácidos grasos estudiados junto con el ajuste de la ecuación de Hill a los datos. Para ello el n_H se fijó a la unidad y se asumió un bloqueo máximo del 100%. En el caso del AP el ajuste de la ecuación de Hill no pudo llevarse a cabo debido a que la máxima concentración que pudo estudiarse (20 μ M) apenas producía un 40% de bloqueo. Con dicho ajuste se pudo comprobar que los ácidos grasos más potentes para

Resultados

bloquear los canales hKv1.5 eran el AO y el AA, obteniéndose en ambos casos valores de CE_{50} en el rango micromolar bajo ($0.4 \pm 0.05 \mu M$ y $1.5 \pm 0.1 \mu M$ para el AO y AA, respectivamente).

Dependencia de voltaje de la activación	V_h (mV)	k	Cinética de deactivación	τ_r (ms)	τ_l (ms)
Control	-14.5 ± 3.7	4.3 ± 0.4	Control	15.3 ± 1.8	82.1 ± 7.9
AP	-16.1 ± 4.9	4.3 ± 0.3	AP	19.0 ± 1.7	89.2 ± 6.4
Control	-12.6 ± 1.6	5.5 ± 0.1	Control	14.9 ± 2.0	66.9 ± 15.4
AS	$-19.4 \pm 2.5^*$	4.6 ± 0.4	AS	$25.9 \pm 7.2^*$	66.3 ± 17.1
Control	-16.4 ± 1.3	7.3 ± 1.2	Control	15.4 ± 2.1	63.4 ± 12.6
AO	$-25.3 \pm 3.2^*$	6.5 ± 0.6	AO	$33.8 \pm 4.5^{**}$	86.3 ± 15.4
Control	-15.3 ± 1.8	5.6 ± 0.6	Control	19.4 ± 2.3	72.6 ± 8.5
AA	$-23.5 \pm 2.5^{**}$	6.1 ± 0.9	AA	$34.1 \pm 5.9^*$	$168.5 \pm 36.4^*$

Tabla IV.4. Efectos de los ácidos grasos sobre la dependencia de voltaje de la activación y sobre la cinética de deactivación de $I_{hKv1.5}$. V_h y k son los valores de los puntos medios y las pendientes, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste de una ecuación de Boltzmann a las curvas de activación. τ_r y τ_l son las constantes de tiempo rápida y lenta obtenidas del ajuste de una función biexponencial a los trazos de las corrientes de cierre. Los datos representan la media \pm E.E.M. de ≥ 4 experimentos. * y ** son $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente, frente a los valores control.

2.5. Comparación de los efectos de los compuestos estudiados y relación estructura actividad

Para poder comparar mejor los efectos producidos por los compuestos estudiados, en la Figura IV.19 se representan juntas todas las curvas concentración-respuesta y los valores de CE_{50} de las etanolamidas (endocannabinoides o cannabimiméticos) y sus correspondientes ácidos grasos. Como se puede observar, en todos los casos las etanolamidas son menos potentes para bloquear los canales hKv1.5 que sus correspondientes ácidos grasos, excluyendo a la AEA y el AA que tienen una potencia similar. Además, con la excepción del AO, cuando el número de átomos de carbono de la cadena acilo aumenta, la potencia de bloqueo también aumenta.

Para profundizar en el análisis de la relación estructura-actividad, se representó el logaritmo de la complejidad de cada molécula frente al bloqueo que producen sobre los canales hKv1.5 a la concentración de $1 \mu M$ (Figura IV.20). El grado de complejidad se calculó mediante la ecuación de Bertz/Hendrickson/Ihlenfeldt (Ecuación III.5) que tiene en

Resultados

cuenta el tamaño de la molécula, la presencia y naturaleza de los diferentes grupos reactivos de cada compuesto y la presencia de dobles enlaces.

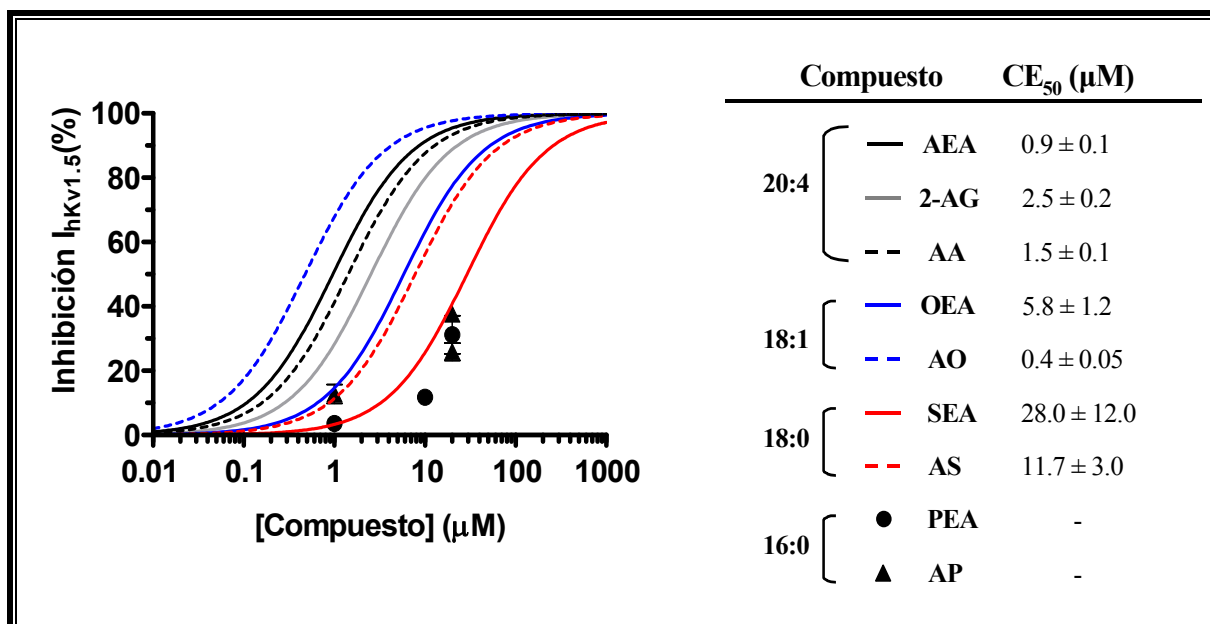


Figura IV.19. Curvas concentración-respuesta para todos los compuestos estudiados. Inhibición de la $I_{hKv1.5}$ a +60 mV en función de la concentración de los compuestos estudiados. Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales, fijando el n_H a la unidad y asumiendo un bloqueo máximo del 100%. Los puntos representan el bloqueo producido por la PEA y el AP. Cada punto representa la media ± E.E.M. de ≥ 4 experimentos.

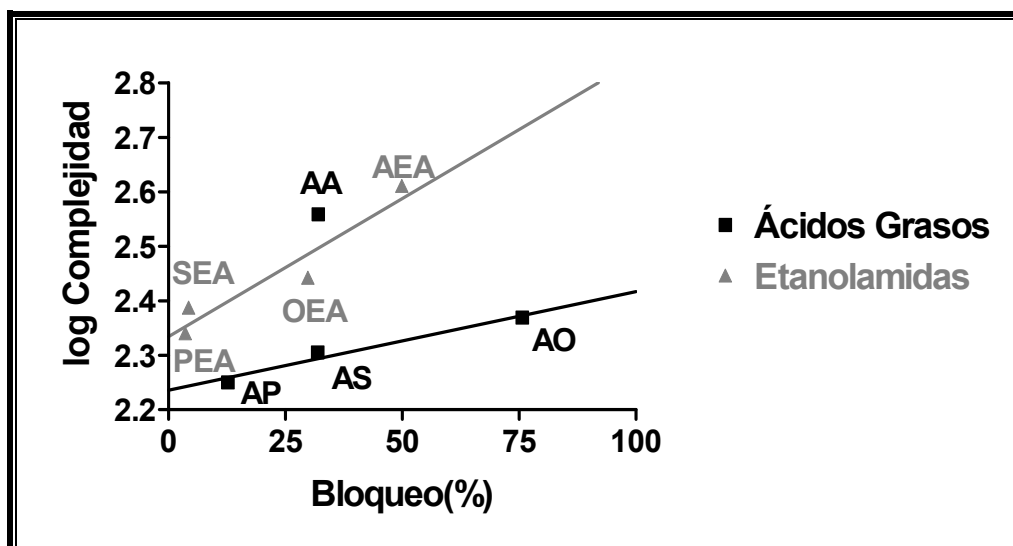


Figura IV.20. Relación estructura-actividad de etanolamidas y ácidos grasos. Logaritmo de la complejidad de cada compuesto representado frente al bloqueo que producen sobre los canales hKv1.5 a la concentración de 1 μM.

Como se puede observar, en ambos casos existe una relación lineal entre el grado de complejidad y el bloqueo. Tanto para las etanolamidas como para los ácidos grasos (a excepción del AA), un aumento en la complejidad de la molécula se correlaciona con un

aumento en la potencia de bloqueo de los canales hKv1.5 ($r^2=0.9158$ para etanolamidas y $r^2=0.9685$ para ácidos grasos).

2.6. Efectos directos de la AEA sobre la corriente auricular humana I_{Kur}

Los canales hKv1.5 generan la corriente I_{Kur} responsable de la repolarización auricular humana (Wang y cols., 1993). Para confirmar que los efectos observados sobre la corriente registrada en sistemas de expresión heterólogos se reproducían en la corriente nativa, en el siguiente grupo de experimentos se estudiaron los efectos directos producidos por la AEA sobre dicha corriente registrada en miocitos auriculares humanos disociados enzimáticamente.

En la Figura IV.21A se muestran los trazos de I_{Kur} en ausencia y en presencia de AEA a la concentración de 1 μ M registrados tras aplicar el protocolo que aparece en la parte superior. En primer lugar se aplicaba un prepulso de 200 ms a +50 mV desde un potencial de fijación de -80 mV para inactivar la corriente de salida de K^+ de rápida activación e inactivación, la I_{to} . De esta forma, mediante un segundo pulso de 500 ms a +50 mV se conseguía registrar una corriente de salida de K^+ de rápida activación y lenta inactivación, la I_{Kur} . La presencia simultánea de RMB y AM630 (antagonistas de receptores CB_1 y CB_2 , respectivamente) a la concentración de 1 μ M redujo la amplitud de la corriente medida al final del pulso en un $22.9 \pm 5.0\%$. En estas condiciones, la aplicación de AEA 1 μ M redujo aún más la amplitud de la I_{Kur} produciendo una inhibición del $48.6 \pm 4.7\%$ ($n=5$, $P<0.05$), resultado casi idéntico al que producía la AEA sobre las corrientes generadas por los canales hKv1.5 en las células *Ltk*. La I_{Kur} registrada en estas condiciones presentaba una inactivación lenta e incompleta con una cinética que se ajustaba a una función monoexponencial ($\tau=34.1 \pm 0.4$ ms). La AEA no modificó la cinética de inactivación de la corriente, de tal manera que la constante de tiempo obtenida fue de $\tau=30.1 \pm 0.5$ ms ($P>0.05$ frente a control).

Si normalizamos la amplitud de la I_{Kur} al tamaño celular obtenemos la densidad de corriente, que aparece representada a los distintos potenciales ensayados tanto en ausencia como en presencia de AEA (Figura IV.21B). Como se puede observar, la AEA reducía significativamente la densidad de corriente a potenciales más positivos de +10 mV.

Los resultados obtenidos en este grupo de experimentos nos permitieron demostrar que el efecto inhibitorio de la AEA sobre la corriente generada por los canales hKv1.5 expresados en líneas celulares de mamífero se reproduce perfectamente (tanto cualitativa como cuantitativamente) cuando se registra la corriente nativa en células auriculares humanas.

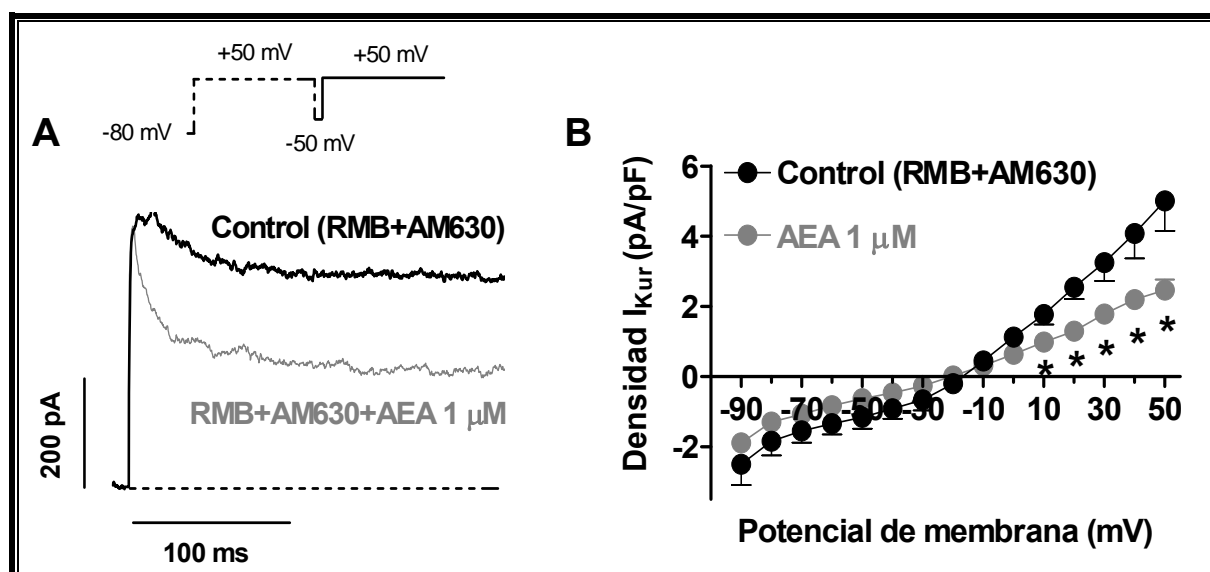


Figura IV.21. Efectos de la AEA sobre la corriente auricular humana I_{Kur} . (A) Trazos de I_{Kur} registrados a +50 mV tras un prepulso de 200 ms a +50 mV en presencia de RMB (1 μ M) y AM630 (1 μ M) con y sin AEA (1 μ M). (B) Relaciones densidad-voltaje para la I_{Kur} en ausencia y presencia de AEA 1 μ M. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de 5 experimentos. * $P < 0.05$ frente a RMB+AM630.

2.7. Efectos directos de la AEA sobre los PAs auriculares de ratón

Para determinar las consecuencias de los efectos de la AEA sobre las características de los PAs se estudiaron los efectos electrofisiológicos de la AEA sobre los PAs rápidos Na^+ -dependientes registrados en aurículas izquierdas aisladas de ratones macho de la cepa C57BL/6J mediante técnicas convencionales de registro de PAs con microelectrodos de vidrio. Se eligió esta especie porque la I_{Kur} está generada por los canales $Kv1.5$ (Nerbonne y Kass, 2005).

La Figura IV.22A muestra los PAs representativos registrados en presencia de RMB y AM630, ambos a la concentración de 1 μ M, y tras la perfusión de AEA 1 μ M. Los PAs se registraron aplicando pulsos rectangulares de 1-2 ms de duración a una frecuencia de estimulación de 3 Hz y con una intensidad un 20% superior al potencial umbral. En condiciones control el valor del potencial de reposo fue de -87.0 ± 1.7 mV mientras que la amplitud del PA fue de 114.4 ± 2.6 mV. La perfusión de AEA no modificó ni el potencial de reposo ($PR_{AEA} = -89.8 \pm 1.5$ mV) ni la amplitud del PA ($APA_{AEA} = 113.9 \pm 2.5$ mV) ($n=7$, $P > 0.05$). Sin embargo, como consecuencia de sus efectos sobre la I_{Kur} , la AEA prolongó de forma significativa la DPA, especialmente la medida al 20% de la repolarización (de 10.3 ± 1.6 a 13.3 ± 2.4 ms, $n=7$, $P < 0.01$) (Figura IV.22B).

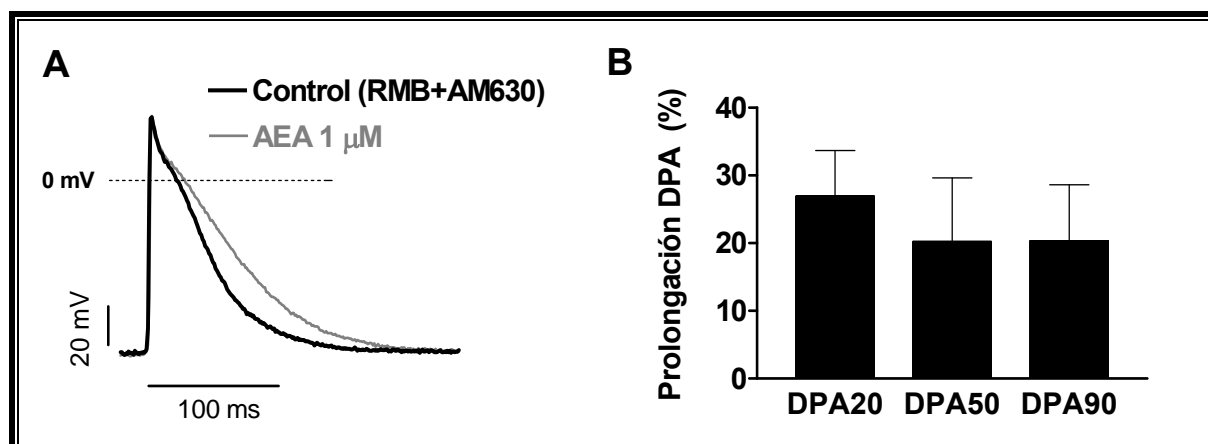


Figura IV.22. Efectos de la AEA sobre PAs cardíacos registrados en preparaciones auriculares de ratón. (A) PAs registrados mediante técnicas convencionales con microelectrodos de vidrio en situación control (en presencia de RMB y AM630 1 μ M) y en presencia de AEA 1 μ M. La línea discontinua representa el valor cero de V_m . (B) Porcentaje de prolongación de la duración del potencial de acción (DPA) medido al 20%, 50% y 90% de la repolarización producido por la AEA. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de 7 experimentos.

3. MECANISMO DE BLOQUEO DE LOS CANALES hKv1.5 POR LOS ENDOCANNABINOIDES

3.1. Modificaciones en las propiedades dinámicas y estructurales de la membrana producidas por los endocannabinoides

Los endocannabinoides y sus análogos son mediadores lipídicos, por lo que se ha sugerido que pueden perturbar inespecíficamente la membrana plasmática y así afectar indirectamente a proteínas de membrana (incluyendo los canales iónicos) (Andersen y cols., 2007; Bruno y cols., 2007). Por lo tanto, un efecto inespecífico debido a la incorporación de estos compuestos en las membranas celulares conllevaría que aquellos compuestos más liposolubles produjeran un bloqueo mayor. Para analizar si los efectos producidos por los endocannabinoides y análogos sobre los canales hKv1.5 se debían a perturbaciones inespecíficas de la membrana utilizamos dos estrategias experimentales. En primer lugar, analizamos la posible relación de la liposolubilidad de cada uno de los compuestos con el bloqueo que ejercen y en segundo lugar, medimos mediante estudios de anisotropía de fluorescencia, la posible perturbación que éstos podían producir en las membranas celulares.

El índice de liposolubilidad de cada compuesto se calculó usando el coeficiente de partición ($\log P$) para el caso de las etanolamidas y el coeficiente de distribución ($\log D$ a $\text{pH}=7.4$) para los ácidos grasos. En la Figura IV.23 se representan dichos coeficientes en función del porcentaje de bloqueo que producía cada compuesto a la concentración de 1 μ M. Como se puede observar, tanto en el caso de las etanolamidas como en el de los ácidos grasos,

la potencia con la que bloqueaban los canales hKv1.5 era independiente de la liposolubilidad de cada compuesto, sugiriendo que los efectos inhibitorios observados no se debían a perturbaciones inespecíficas.

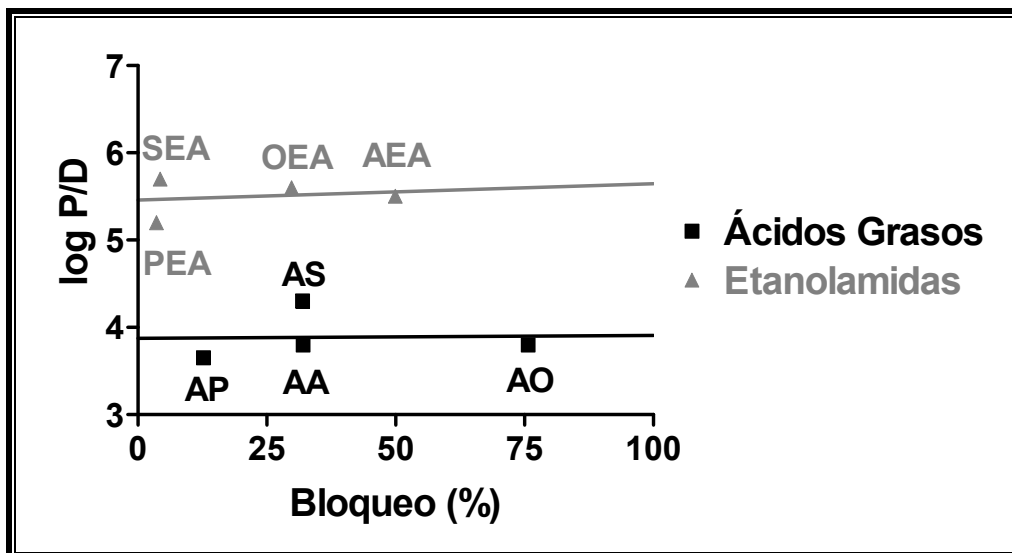


Figura IV.23. Relación liposolubilidad-bloqueo de etanolamidas y ácidos grasos. Coeficientes de partición (logP) o de distribución (logD) de cada compuesto representado frente al porcentaje de bloqueo que producen sobre los canales hKv1.5 a la concentración de 1 μ M.

A continuación analizamos la posible modificación de la fluidez, orden y microviscosidad de la membrana producida por la AEA, el 2-AG, el LPI, la PEA, el AA y el AP en las células *Ltk*⁻ que expresan de manera estable el canal hKv1.5 midiendo los cambios en la anisotropía de fluorescencia. La fluidez de membrana se caracterizó cuantificando la velocidad y amplitud de los movimientos rotacionales de la sonda lipofílica PA-DPH en la membrana plasmática (Guizy y cols., 2008; Amorós y cols., 2010). La PA-DPH es una molécula con forma lineal, que posee una cabeza polar con carga negativa (ácido propiónico) y una cola apolar de unas dimensiones similares a las de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos de membrana. Además, su vida media de fluorescencia coincide con el curso temporal de los movimientos rotacionales de los lípidos de interés. La sonda se incorpora a la membrana anclándose en su superficie con el fluoróforo (DPH) paralelo a las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos circundantes.

La anisotropía de fluorescencia en estado estacionario (r_{ss}) proporciona información acerca de los tiempos de correlación (microviscosidad) y las amplitudes (orden) de los movimientos rotacionales de la sonda fluorescente en la membrana, ponderados por su vida media de fluorescencia. Puesto que ambas informaciones están mezcladas en los valores obtenidos de r_{ss} , estos valores sólo fueron usados como control para los posteriores

Resultados

experimentos de anisotropía de fluorescencia con resolución temporal $[r(t)]$. La intensidad de fluorescencia de la sonda PA-DPH ($1\ \mu\text{M}$) en condiciones control decayó siguiendo un modelo biexponencial con dos componentes: uno mayoritario (aproximadamente el 90% de la intensidad total) con una vida media de 5.7 ns y uno de menor amplitud, con una vida media de 2.4 ns. Ninguno de los endocannabinoides modificó significativamente la vida media de la sonda incorporada en la membrana. En la Figura IV.24 se muestran los valores obtenidos de r_{ss} ($\lambda_{exc}=375\text{ nm}$; $\lambda_{em}=450\text{ nm}$) de la sonda PA-DPH incorporada en las células tanto en condiciones control como tras la incubación con la AEA, el 2-AG, el LPI, la PEA, el AA y el AP a la concentración de $1\ \mu\text{M}$. El tiempo de incubación fue de 20 minutos puesto que se corresponde con la duración media de los experimentos de electrofisiología. Durante este tiempo el valor de r_{ss} en condiciones control se mantuvo constante (0.282 ± 0.003), por lo que podemos asumir que la sonda se incorpora en la membrana sin sufrir ninguna internalización aparente. Además ninguno de los compuestos estudiados modificó significativamente la r_{ss} .

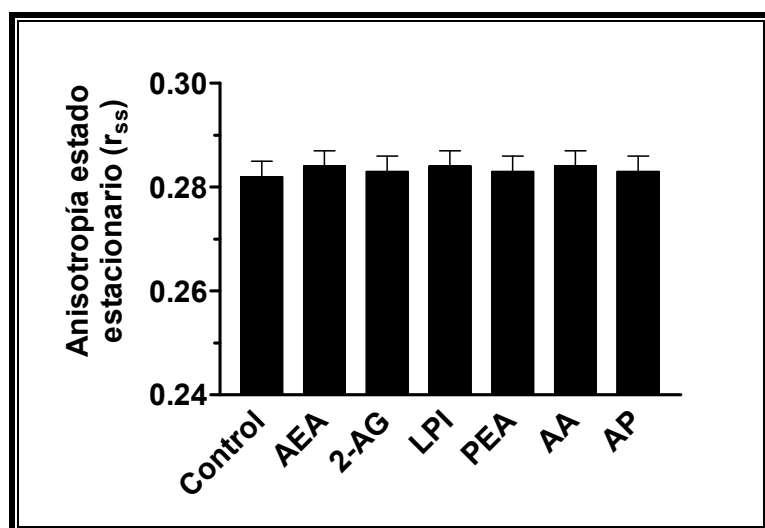


Figura IV.24. Efectos de los endocannabinoides y ácidos grasos sobre la anisotropía de fluorescencia en estado estacionario (r_{ss}) de la sonda PA-DPH. Valores medios de r_{ss} de la sonda PA-DPH ($1\ \mu\text{M}$) incorporada a las células *Ltk*, medidos en condiciones control y en células incubadas con AEA, 2-AG, LPI, PEA, AA y AP a la concentración de $1\ \mu\text{M}$ durante 20 minutos.

A continuación realizamos las medidas de $r(t)$ para poder cuantificar por separado el orden lipídico y la microviscosidad de la membrana a partir de los valores de anisotropía límite o residual (r_{∞}) y de los tiempos de correlación rotacional (ϕ), respectivamente. Como se muestra en la Figura IV.25A, la $r(t)$ de PA-DPH (en situación control y en presencia de AEA y PEA, el compuesto más y menos potente para bloquear los canales hKv1.5 respectivamente) decae en pocos nanosegundos hasta un valor de r_{∞} y con una constante de tiempo que representa el valor de ϕ y que se obtienen del ajuste a la ecuación III.11. Generalmente, un aumento en el orden de los fosfolípidos de la membrana provocaría un aumento en los valores de r_{∞} de la sonda fluorescente.

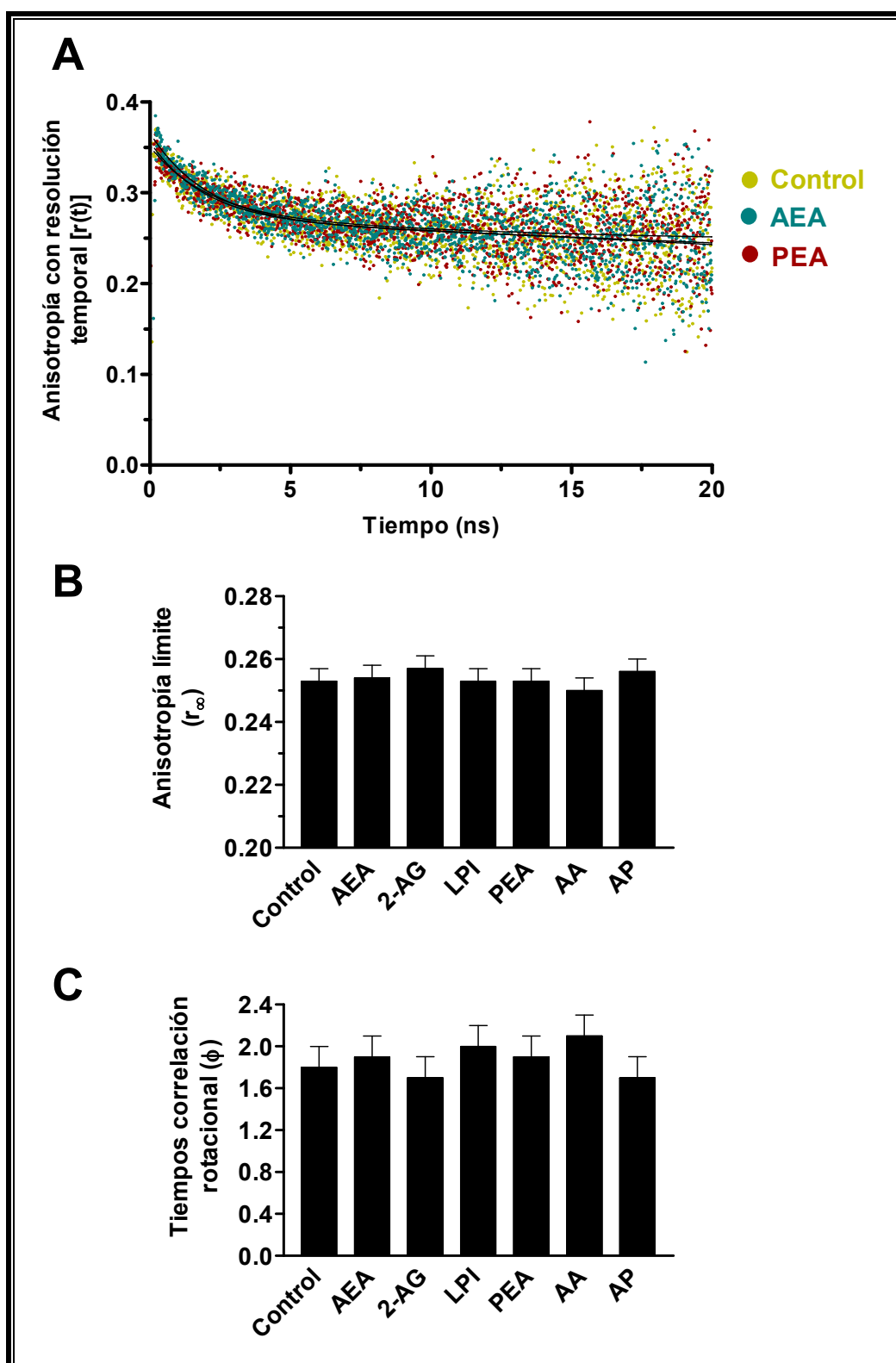


Figura IV.25. Efectos de los endocannabinoides y ácidos grasos sobre las propiedades dinámicas y estructurales de la membrana. (A) Medida en la anisotropía de fluorescencia con resolución temporal $[r(t)]$ de la sonda PA-DPH incorporada a las células *Ltk* en condiciones control y en presencia de AEA o PEA. Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación III.11. (B y C) Valores medios de anisotropía límite (r_{∞} , B) y de tiempos de correlación rotacional (ϕ , C) de la sonda PA-DPH (1 μ M) incorporada a las células *Ltk*, medidos en condiciones control e incubadas con AEA, 2-AG, LPI, PEA, AA y AP durante 20 minutos todos ellos a la concentración de 1 μ M.

Sin embargo, la incubación de las células con AEA, 2-AG, LPI, PEA, AA y AP durante 20 minutos no modificó significativamente los valores de r_{∞} (0.253 ± 0.004) (Figura IV.25B). Los valores de ϕ proporcionan información a nivel dinámico relacionada con la microviscosidad de las membranas celulares; la incubación de las células con los distintos compuestos tampoco modificó significativamente los valores de ϕ (1.8 ± 0.2 ns) (Figura IV.25C). Resultados similares se obtuvieron para ambos parámetros cuando los compuestos se incubaron durante 120 minutos.

Estos resultados no permiten descartar por completo que los endocannabinoides y análogos estén produciendo alguna modificación en el orden y la microviscosidad de la membrana, pero en cualquier caso sugieren que todos los compuestos producen perturbaciones inespecíficas similares, independientemente de su potencia para bloquear los canales hKv1.5.

3.2. Implicación del calcio intracelular y de la proteína quinasa C en los efectos de AEA

Se ha descrito en numerosas ocasiones que los ligandos endocannabinoides inducen un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Esta acción se produce fundamentalmente mediante la activación de la fosfolipasa C (PLC) y activación de los receptores de inositol trifosfato (IP3) del retículo (Díaz-Laviada y Ruiz-Llorente, 2005; De Petrocellis y cols., 2007). Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ modulan diversas vías de señalización que podrían estar modificando la $I_{hKv1.5}$. Para descartar que los efectos observados se debieran a variaciones en la $[Ca^{2+}]_i$, analizamos los efectos de la AEA (1 μ M) añadiendo BAPTA (20 mM), un potente quelante de Ca^{2+} , en lugar de EGTA en la solución interna. Como se observa en las Figuras IV.26A y B, en las células dializadas con BAPTA, la AEA redujo la amplitud de la $I_{hKv1.5}$ medida al final del pulso en un $48.3 \pm 2.7\%$ ($n=5$), una reducción no significativamente distinta a la producida por la AEA en células dializadas con EGTA ($P > 0.05$). Por lo tanto podemos asumir que una posible modificación en la $[Ca^{2+}]_i$ no interviene en el bloqueo de los canales hKv1.5 producido por la AEA.

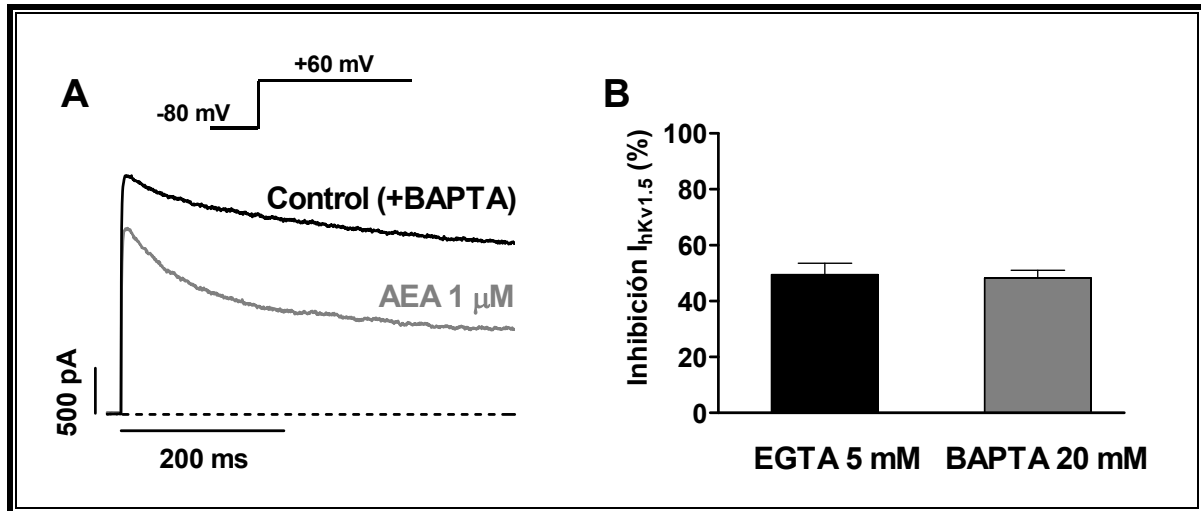


Figura IV.26. Efectos de la AEA sobre la $I_{hKv1.5}$ en presencia de un quelante de Ca^{2+} . (A) Trazos de $I_{hKv1.5}$ registrados tras aplicar pulsos de 500 ms desde -80 a +60 mV en ausencia y presencia de 1 μ M de AEA. En ambos casos la solución interna que dializaba la célula contenía BAPTA 20 mM. (B) Porcentaje de inhibición de $I_{hKv1.5}$ a +60 mV producida por 1 μ M de AEA en células dializadas con solución interna que contenía EGTA o BAPTA.

La AEA es capaz de regular multitud de enzimas, entre ellas se ha descrito que la AEA puede regular la proteína quinasa C (PKC) en cerebro de ratón uniéndose al sitio regulado por diacilglicerol (De Petrocellis y cols., 1995). Por otro lado se sabe que la corriente auricular humana I_{Kur} , generada por los canales Kv1.5, es inhibida por la activación de PKC (Li y cols., 1996b; Williams y cols., 2002). Por lo tanto, para determinar si la inhibición de la $I_{hKv1.5}$ se debía a la activación de PKC por parte de los endocannabinoides, estudiamos los efectos de la AEA en presencia de estaurosporina (0.1 μ M), que es un inhibidor de dicha quinasa.

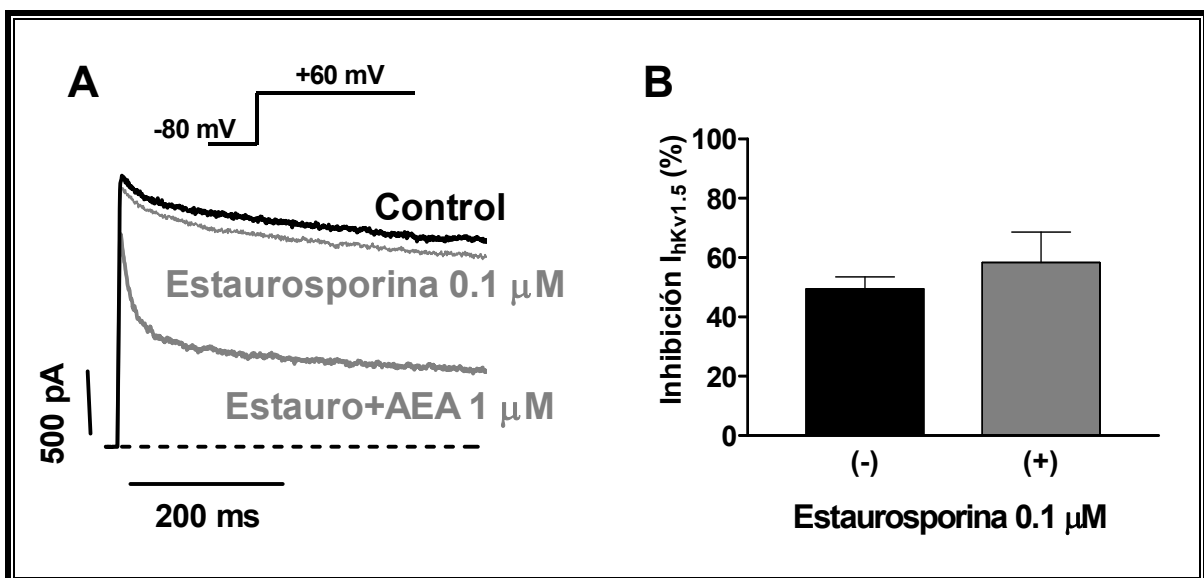


Figura IV.27. Implicación de la PKC en los efectos de la AEA sobre la $I_{hKv1.5}$. (A) Trazos de $I_{hKv1.5}$ registrados tras aplicar pulsos de 500 ms desde -80 a +60 mV en situación control y al aplicar estaurosporina 0.1 μ M en ausencia y presencia de 1 μ M de AEA. (B) Porcentaje de inhibición de $I_{hKv1.5}$ a +60 mV producida por 1 μ M de AEA en ausencia y presencia de estaurosporina.

Los resultados obtenidos en estas condiciones se muestran en las Figuras IV.27A y B. Como se puede observar la inhibición producida por la AEA 1 μ M es similar en ausencia ($49.4 \pm 4.1\%$ a +60 mV) y en presencia ($58.4 \pm 10.2\%$) de estaurosporina ($P > 0.05$, $n=4$), lo que sugiere que la PKC no interviene en los efectos inhibitorios de la AEA sobre la $I_{hKv1.5}$.

3.3. Los endocannabinoides interaccionan con la parte extracelular de los canales hKv1.5

En estudios previos se ha demostrado que el bloqueo de canales iónicos producido por endocannabinoides sólo aparecía cuando éstos eran aplicados extracelularmente en algunos casos e intracelularmente en otros (Poling y cols., 1996; Oliver y cols., 2004; Chemin y cols., 2001). Para profundizar en el mecanismo de bloqueo en los canales hKv1.5, decidimos estudiar los efectos producidos por la AEA al aplicarla en la cara extracelular e intracelular de la membrana comparando el bloqueo producido al añadirla en la solución externa o en la solución interna. Cuando la AEA fue aplicada intracelularmente, produjo una reducción de la $I_{hKv1.5}$ mucho menor que la obtenida cuando era aplicada extracelularmente ($6.2 \pm 2.5\%$ frente $49.4 \pm 4.1\%$ a +60mV, $P < 0.01$) tal y como se puede ver en las Figuras IV.28A y B. También se puede observar que en células dializadas con AEA, la aplicación extracelular del endocanabinoide redujo la corriente en un porcentaje similar al de las células no dializadas (Figuras IV.28A y B). Puesto que la AEA es degradada intracelularmente por la enzima FAAH, decidimos repetir estos mismos experimentos con la MetAEA (su análogo no hidrolizable) para descartar que la ausencia de efecto de la AEA intracelular se debiera a una posible degradación de la misma. La MetAEA intracelular redujo la $I_{hKv1.5}$ a +60 mV en tan solo un $5.3 \pm 2.4\%$ (Figura IV.28B y C), un bloqueo significativamente menor al que produce la MetAEA desde la cara extracelular y muy similar al que producía la AEA intracelular.

Estos resultados demuestran que el bloqueo del canal hKv1.5 producido por la AEA se produce como consecuencia de la interacción del endocanabinoide con la cara extracelular del canal.

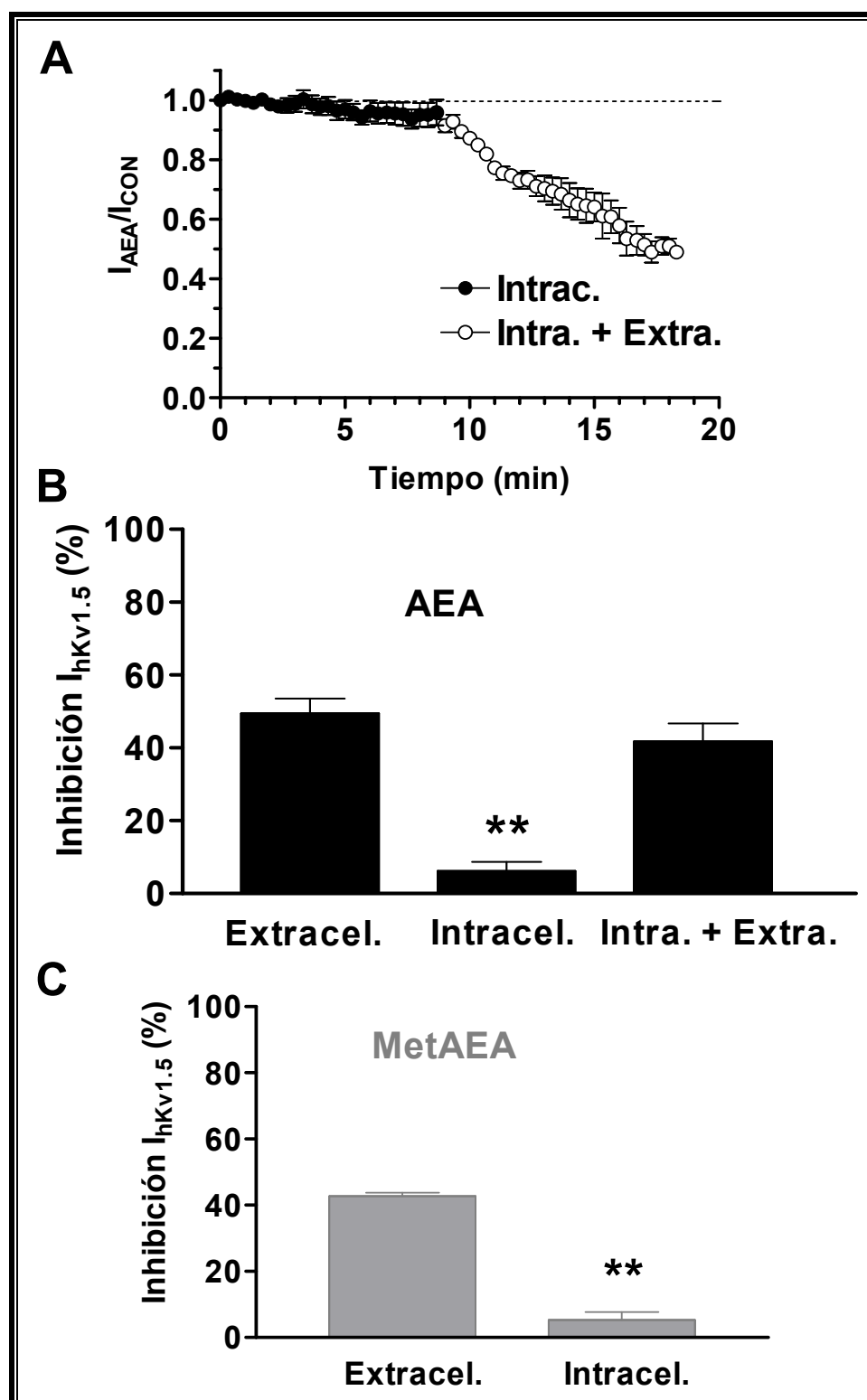


Figura IV.28. Efectos de la AEA y de la MetAEA aplicadas en la cara extra o intracelular de la membrana. **(A)** Curso temporal del bloqueo de los canales $hKv1.5$ producido por la AEA $1 \mu M$ aplicada intracelularmente (círculos negros) o desde ambos lados de la membrana (círculos blancos). **(B)** Porcentaje de inhibición de la $I_{hKv1.5}$ a $+60$ mV producida por la AEA a la concentración de $1 \mu M$ aplicada extracelularmente, intracelularmente o ambos. **(C)** Porcentaje de inhibición de la $I_{hKv1.5}$ a $+60$ mV producida por la MetAEA a la concentración de $1 \mu M$ aplicada extracelularmente o intracelularmente. ** $P < 0.01$ frente al bloqueo producido extracelularmente. Los puntos/las barras representan la media \pm E.E.M. de ≥ 5 experimentos.

Resultados

El TEA es un bloqueante de canales de K^+ que, aplicado extracelularmente, se une a la porción extracelular del canal hKv1.5 (Caballero y cols., 2002). Por ello, a continuación decidimos llevar a cabo experimentos para analizar la posible competición entre AEA y TEA (100 mM). De esta manera si el TEA y la AEA compitieran por un sitio receptor común en el canal hKv1.5, el bloqueo producido por la AEA en combinación con el TEA debería ser menor que el producido por la AEA sola.

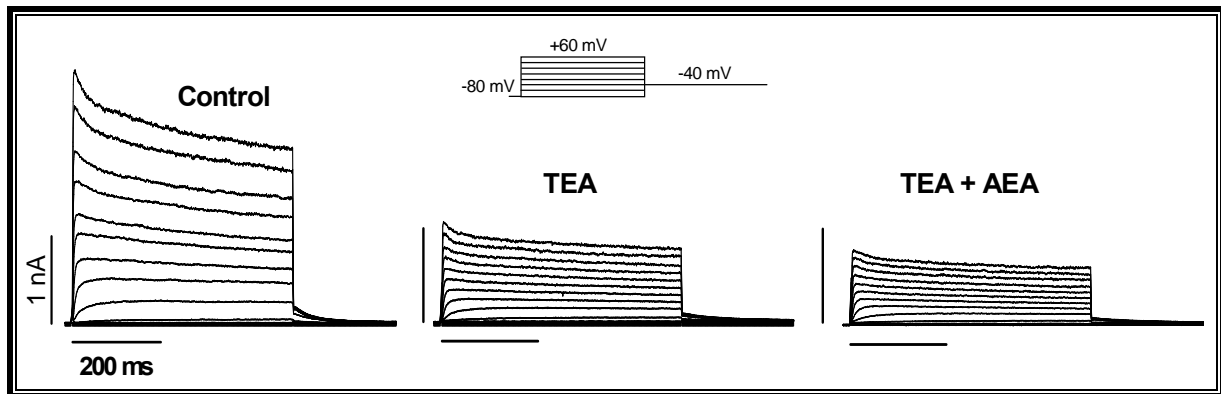


Figura IV.29. Competición del TEA extracelular y la AEA por el sitio de unión al canal hKv1.5. Familias de trazos de $I_{hKv1.5}$ obtenidas tras aplicar pulsos de 500 ms de duración desde -80 mV hasta potenciales entre -80 y +60 mV así como las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar la membrana a -40 mV en situación control, en presencia de TEA 100 mM solo o en combinación con AEA 1 μ M.

En la Figura IV.29 se muestran familias de trazos de $I_{hKv1.5}$ en situación control, en presencia de TEA 100 mM aplicado extracelularmente y tras la posterior adición de AEA 1 μ M, registradas tras aplicar el protocolo de pulsos que aparece en la parte superior. El TEA inhibió la $I_{hKv1.5}$ a +60 mV en un $54.3 \pm 3.4\%$ y lo que es más importante, disminuyó notablemente el bloqueo producido por la AEA ($15.5 \pm 2.5\%$) (Figuras IV.29 y 30). Por lo tanto, estos resultados sugieren que ambos compuestos estarían compitiendo por el mismo sitio de unión en los canales hKv1.5.

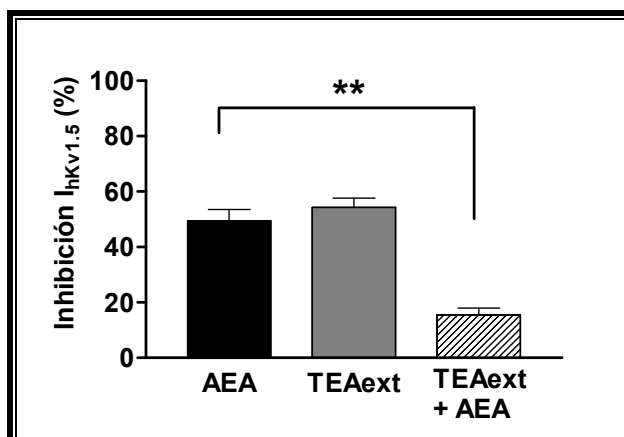


Figura IV.30 Competición del TEA extracelular y la AEA por el sitio de unión al canal hKv1.5. Porcentaje de inhibición de la $I_{hKv1.5}$ a +60 mV producido por la AEA 1 μ M, por el TEA (100 mM) aplicado extracelularmente y por la combinación de TEA y AEA. ** $P < 0.01$ frente al bloqueo en ausencia de TEA. Las barras representan la media \pm E.E.M. de 5 experimentos.

Resultados

En los canales *Shaker* la sensibilidad al TEA viene determinada por el aminoácido T449 localizado en la zona exterior de acceso al poro (MacKinnon y Yellen, 1990) y cuya posición equivalente en los canales hKv1.5 es la R487. Está descrito que al introducir una tirosina en esa posición, la sensibilidad de los canales hKv1.5 al TEA aumenta, lo que demuestra que ese residuo determina el efecto del TEA en estos canales (Fedida y cols., 1999; Kurata y cols., 2006). Por tanto, en el siguiente grupo de experimentos empleamos el canal hKv1.5 con la mutación R487Y expresado de manera estable en células *Ltk* para determinar la posible unión de la AEA a este residuo.

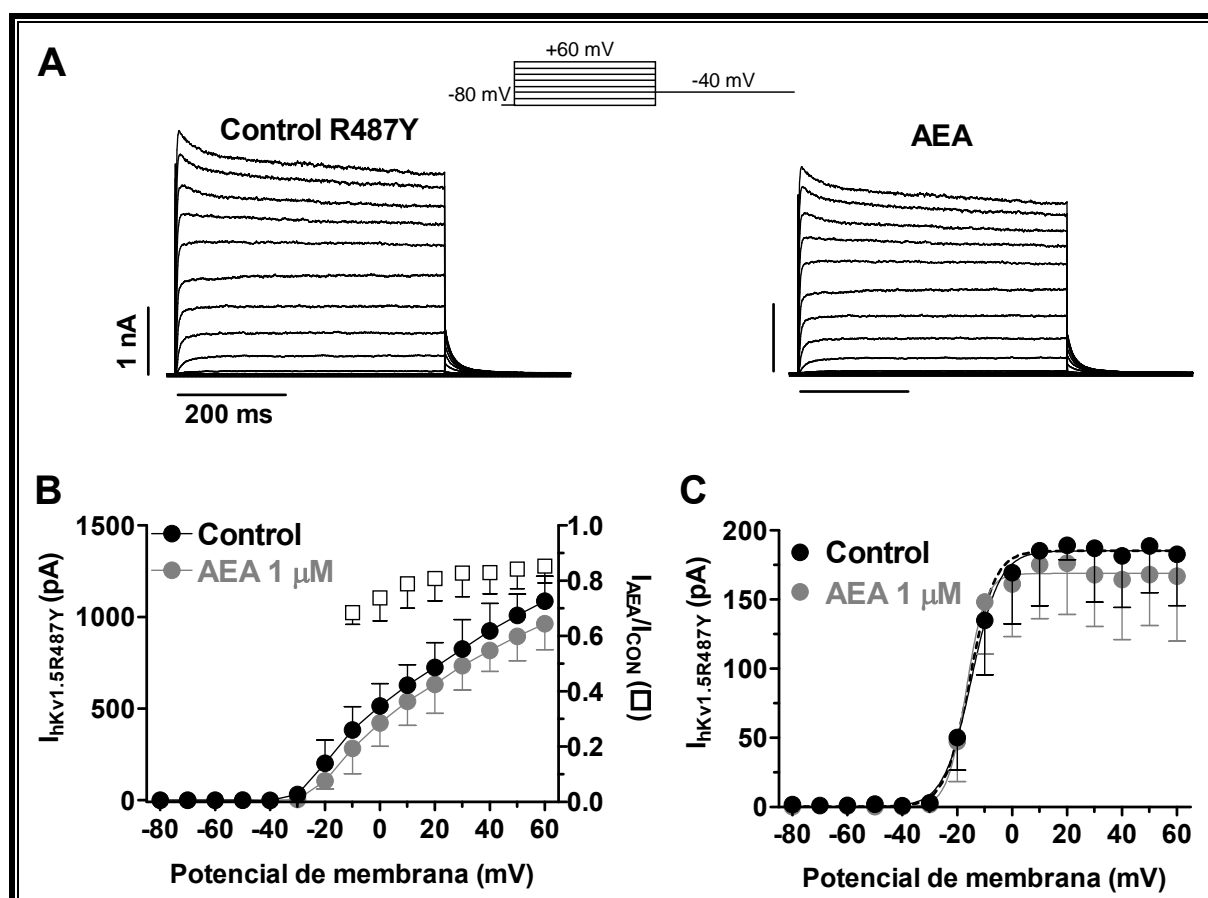


Figura IV.31. Efectos de la AEA sobre los canales Kv1.5 R487Y. (A) Familias de trazos de $I_{hKv1.5R487Y}$ obtenidas tras aplicar pulsos de 500 ms de duración desde -80 mV hasta potenciales entre -80 y +60 mV así como las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar la membrana a -40 mV en ausencia (panel de la izquierda) y en presencia (panel de la derecha) de AEA 1 μM. (B) Relación I-V de la $I_{hKv1.5R487Y}$ en situación control (círculos negros) y en presencia de AEA a la concentración de 1 μM (círculos grises). Los cuadrados representan la corriente relativa calculada como el cociente de la amplitud de la corriente en presencia y en ausencia del compuesto. (C) Curvas de activación de los canales hKv1.5 R487Y en ausencia y en presencia de AEA a la concentración de 1 μM. Las líneas continuas representan el ajuste de una función de Boltzmann a los datos experimentales. La línea discontinua representa el ajuste de la curva de activación en presencia de AEA normalizado a la amplitud del control. Cada punto representa la media ± E.E.M. de 6 experimentos.

En la parte superior de la Figura IV.31 se muestran los trazos de corriente generados por el canal con la mutación R487Y registrados al aplicar pulsos de 500 ms de duración desde -80

Resultados

hasta +60 mV en situación control y en presencia de AEA 1 μ M. Se puede observar que la AEA apenas redujo la corriente medida al final del pulso a +60 mV en un $14.5 \pm 6.4\%$, reducción significativamente menor que la producida en canales WT ($P < 0.01$, $n=6$). Más aun, la AEA no bloqueó significativamente los canales Kv1.5 R487Y a ninguno de los potenciales ensayados ni afectó a la dependencia de voltaje de la activación de los canales.

Idénticos resultados se obtuvieron cuando se analizaron los efectos del 2-AG a la concentración de 1 μ M. El 2-AG tan solo bloqueó los canales mutados en un $13.9 \pm 5.8\%$, porcentaje significativamente menor al bloqueo producido sobre los canales WT (Figura IV.32).

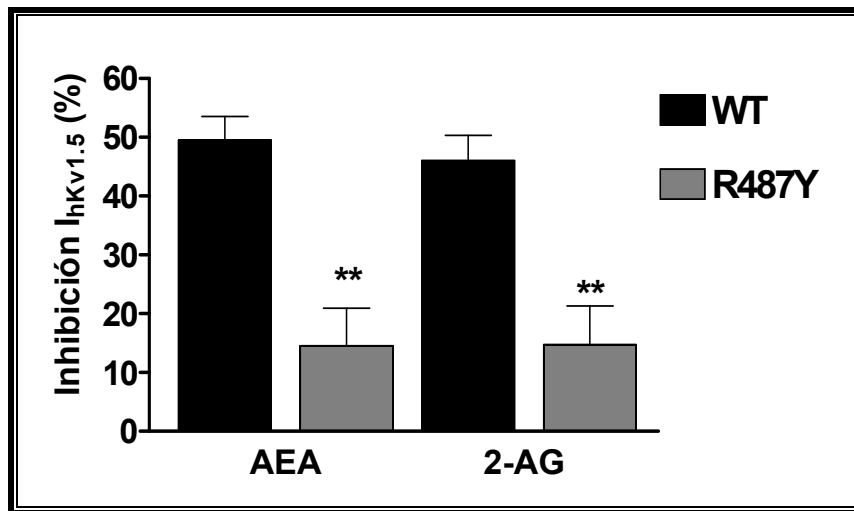


Figura IV.32. Efectos de la AEA y el 2-AG sobre los canales Kv1.5 R487Y. Inhibición de la corriente a +60 mV producida por la AEA y el 2-AG a la concentración de 1 μ M en células que expresaban de manera estable el canal hKv1.5 WT o el mutante R487Y. Cada barra representa la media \pm E.E.M. de ≥ 5 experimentos. ** $P < 0.01$ frente al bloqueo sobre canales WT.

Por lo tanto, este grupo de resultados sugiere que el residuo cargado positivamente (R487) resulta crítico para el bloqueo de los canales hKv1.5 por parte de la AEA y el 2-AG y además refuerza la hipótesis de que los efectos producidos por la AEA y el 2-AG se deben a una interacción con la cara externa del canal hKv1.5.

4. EFECTOS DE LOS ENDOCANNABINOIDES MEDIADOS A TRAVÉS DE RECEPTOR SOBRE LOS CANALES $hKv1.5$

En la mayoría de estudios en los que se describen los efectos de los endocannabinoides sobre el aparato cardiovascular, éstos están mediados a través de la interacción de dichos compuestos con sus receptores (Hillard, 2000; Randall y cols., 2002; Pacher y cols., 2005a, 2005b; Ashton y Smith, 2007). En ellos se ha descrito que los endocannabinoides son capaces de disminuir la frecuencia y contractilidad cardíaca *in vivo* a través de la activación de los receptores CB_1 (Wheal y cols., 2007; Bátakai y Pacher, 2009), aunque otros estudios atribuyen esos efectos a otro receptor distinto del CB_1 y/o CB_2 (Ford y cols., 2002; Batkai y cols., 2004a). El receptor que surgió como principal candidato de receptor de endocannabinoides no- CB_1 /no- CB_2 fue el receptor huérfano acoplado a proteínas G GPR55 (Baker y cols., 2006; Oka y cols., 2007; Pertwee, 2007; Ryberg y cols., 2007).

Sin embargo se conoce muy poco acerca de los efectos que la estimulación de estos receptores pueden ejercer sobre la actividad eléctrica cardíaca, por lo que, a continuación estudiamos los efectos de los endocannabinoides sobre la $I_{hKv1.5}$ mediados a través de la activación de los receptores CB.

4.1. Expresión del ARNm de receptores CB en muestras auriculares humanas

Se ha propuesto que el SCE se activa en situaciones patológicas en las que se ha observado un aumento en la síntesis de endocannabinoides y/o un aumento en la expresión de los receptores CB (Varga y cols., 1998; Wang y cols., 2001; Pertwee 2005; Nacaratto y cols., 2010; Miller y Devi, 2011). En el miocardio de ratas espontáneamente hipertensas la expresión de receptores CB_1 estaba aumentada en comparación con su expresión en ratas normotensas (Batkai y cols., 2004b) y en arterias de ratas y humanos la expresión del receptor CB_2 estaba aumentada en aquellas que presentaban placas de ateroma (Steffens y cols., 2005). Además en los estudios RIO (Rimonabant In Obesity), los pacientes obesos tratados un año con RMB presentaban una discreta reducción de la presión arterial, que aumentaba en el subgrupo de los pacientes diabéticos o con hiperlipidemia. Estos y otros resultados obtenidos en diferentes estudios apuntan a una activación del SCE en ciertas patologías del aparato cardiovascular (Hilley, 2009; Miller y Devi, 2011; Quercioli y cols., 2011), por lo que quisimos saber si esto mismo podría ocurrir en el caso de la FAC. Para ello analizamos la

expresión de los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 en muestras auriculares humanas de pacientes en RS y con FAC.

4.1.1 PCR semicuantitativa

Se llevó a cabo una RT-PCR a partir del ARN extraído de muestras de orejuela de aurícula derecha de pacientes que iban a ser sometidos a cirugía cardíaca con bomba extracorpórea, tanto en RS (n=7) como con FAC (n=7), tal y como se explica en el apartado III.8 de la presente Tesis Doctoral.

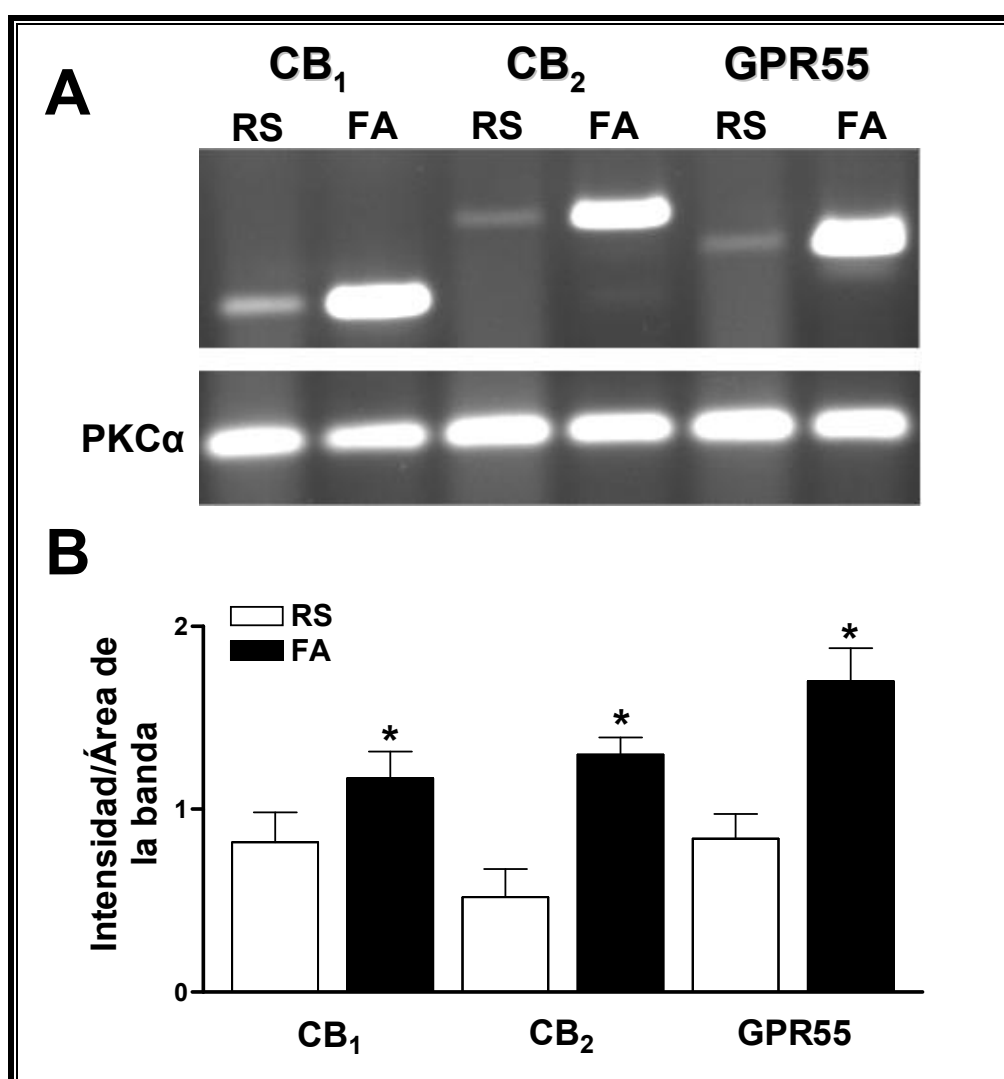


Figura IV.33. Expresión del ARNm de los receptores CB₁, CB₂ y GPR55. (A) Gel de agarosa con los productos obtenidos de la amplificación de muestras obtenidas de un paciente en RS y de uno con FA. Se usó como control interno la PKCα. (B) Análisis densitométrico de las bandas del gel de agarosa de los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 en muestras de pacientes en RS y con FA. *P < 0.05 frente a datos de RS. Los datos representan la media ± E.E.M. de 7 muestras.

En la Figura IV.33A se muestra un gel representativo de los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR para el receptor CB₁, CB₂ y GPR55 de las muestras de un paciente en RS y de un paciente con FAC. La PKC α fue usada como control interno, puesto que su expresión no se ve modificada en FAC (Voigt y cols., 2007). Como se puede observar en la muestra del paciente en RS, el ARNm de los tres receptores está presente, y la expresión de todos ellos se ve claramente aumentada en la muestra del paciente con FAC.

A continuación se realizó un análisis densitométrico de las bandas cuyos resultados aparecen en la Figura IV.33.B. En ella están representados los valores de las medias de las intensidades de las bandas (normalizadas al área medida de cada banda) de los tres receptores tanto de muestras procedentes de pacientes en RS como con FAC. Se puede observar que la intensidad de las bandas de los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 es significativamente mayor en las muestras de pacientes con FAC.

Por lo tanto estos resultados sugieren que en condiciones fisiológicas los tres receptores se expresan en la aurícula y que la FAC induce un aumento marcado de su expresión.

4.1.2 PCR cuantitativa

Para cuantificar la expresión de los receptores CB, realizamos una RT-qPCR. Ésta fue llevada a cabo en el servicio de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas (CSIC) utilizando el equipo 7900 HT-Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con los oligonucleótidos y sondas correspondientes según las especificaciones del fabricante.

El análisis de los resultados se realizó usando el método de comparación de los valores del ciclo C_t (ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra se hace detectable por encima del fondo) (Ecuación III.12). En primer lugar los valores de C_t para los receptores CB se normalizaron con respecto al valor C_t del control interno ARNr18S y a continuación dichos valores (ΔC_t) se transformaron en valores de expresión relativa mediante la ecuación $y=2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{tRS} - \Delta C_{tFAC}$ (Figura IV.34).

Los resultados muestran que la expresión relativa de los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 en las muestras de pacientes con FAC son un 18.5%, un 11.3% y un 67.7%, respectivamente, mayores que en las muestras de pacientes en RS. Coincidiendo con los resultados obtenidos anteriormente en la PCR semicuantitativa, la expresión relativa de los tres receptores es mayor en las muestras de pacientes con FAC que en las de pacientes en RS, siendo este aumento más marcado en el caso del receptor GPR55 (Figura IV.34).

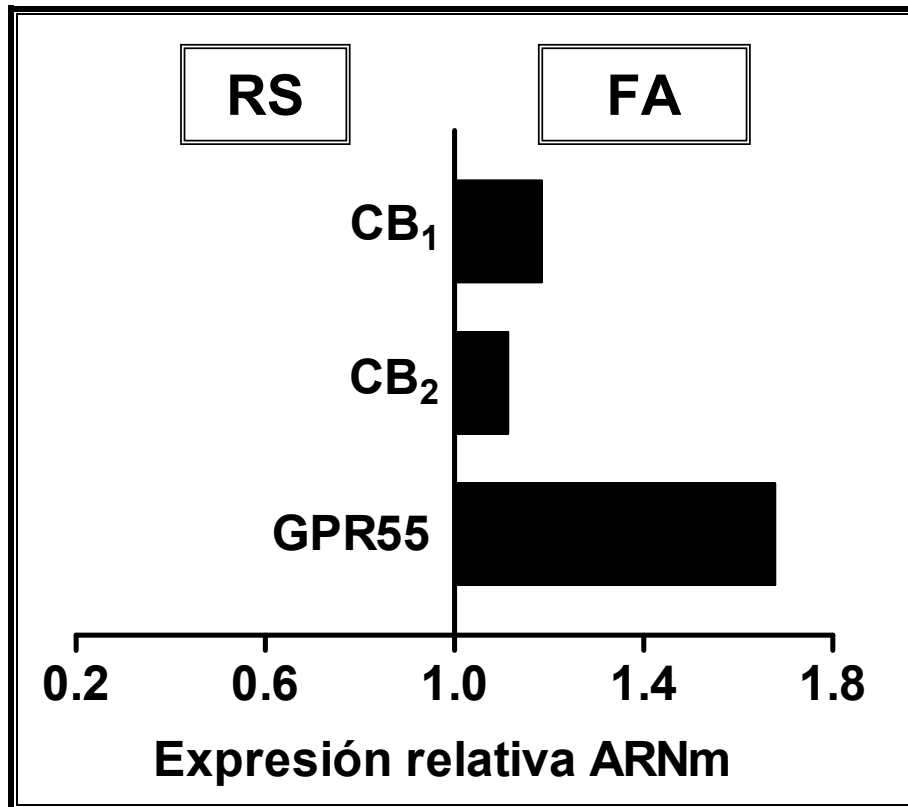


Figura IV.34. Cuantificación de la expresión de ARNm de los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 por RT-qPCR. Histograma de la expresión relativa de ARNm en muestras de tejido auricular humano de pacientes con FA con respecto a las de pacientes en RS. Los resultados fueron normalizados a la expresión del gen constitutivo ARNr18S.

Estos resultados demuestran que los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 se expresan en el tejido cardíaco auricular humano y que además, su expresión es mayor en muestras procedentes de pacientes con FAC que en muestras de pacientes en RS.

4.2. Efectos de la estimulación selectiva del receptor CB₁ sobre la $I_{hKv1.5}$

Para la realización de este grupo de experimentos, se utilizaron células CHO que expresaban de forma estable el receptor CB₁ (CHO-CB1) y que se transfectaron transitoriamente con el ADNc que codifica la expresión del canal hKv1.5. Se analizaron los efectos del agonista CB WIN55,212-2 mediados a través de receptor sobre la $I_{hKv1.5}$ registrada mediante la técnica del parche de membrana.

Las células CHO transfectadas de manera estable con el ADNc que codifica para el receptor CB₁ son un sistema de expresión bien estudiado y caracterizado y constituye un buen modelo para estudiar efectos mediados a través de este receptor (Rueda y cols., 2000). Además, las características cinéticas y voltaje-dependientes de la corriente generada al transfectar el canal hKv1.5 en esta línea celular no eran significativamente distintas a las de la

Resultados

$I_{hKv1.5}$ registrada en células *Ltk*. Por otro lado, se eligió el WIN55,212-2 como agonista del receptor CB_1 porque tiene mayor afinidad por estos receptores que la AEA o el 2-AG y porque su eficacia relativa para el receptor CB_1 también es mayor que la de estos endocannabinoides (Pertwee, 2008).

En la Figura IV.35 se representan trazos de $I_{hKv1.5}$ registrados en células CHO- CB_1 , obtenidos al aplicar un pulso de 500 ms de duración a +60 mV desde un potencial de fijación de -80 mV junto con las corrientes de cierre registradas al repolarizar la membrana a -40 mV. En la figura se muestran los trazos de corriente en situación control y en presencia de WIN 55,212-2 a la concentración de 1 μ M.

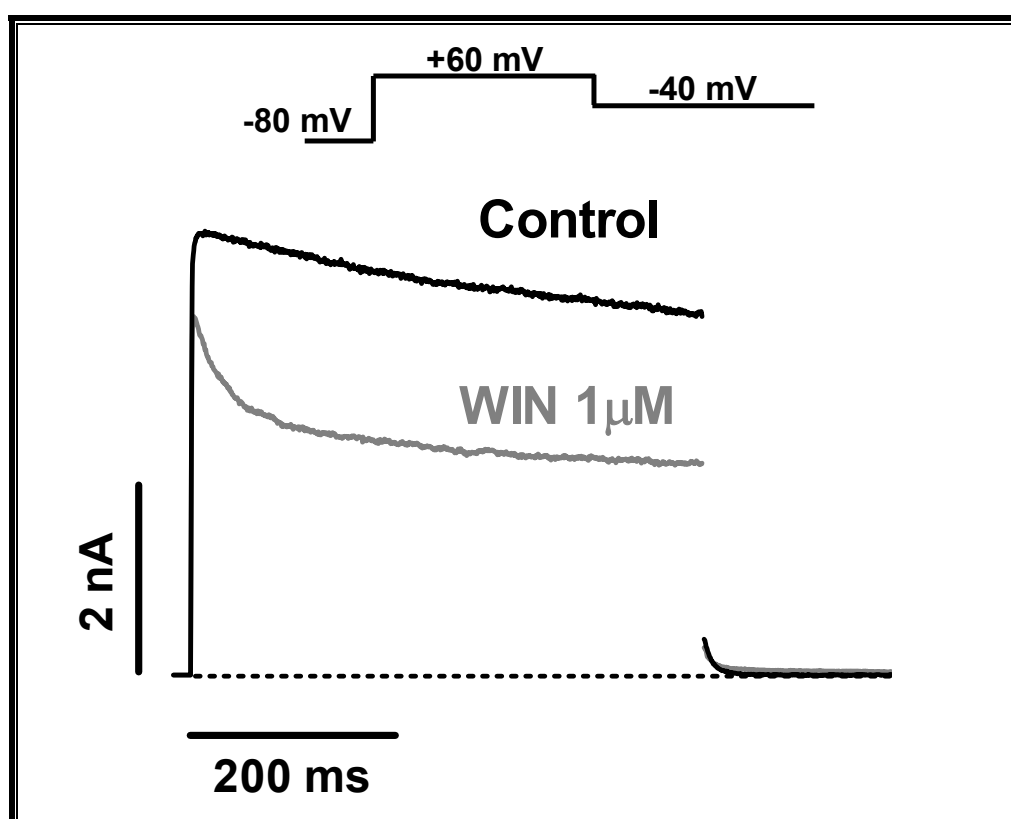


Figura IV.35. Efectos del WIN55,212-2 sobre la $I_{hKv1.5}$ en células CHO- CB_1 . Trazos de $I_{hKv1.5}$ registrados en células CHO- CB_1 tras aplicar un pulso de 500 ms de duración desde -80 hasta +60 mV, junto con las corrientes de cierre registradas al repolarizar la membrana a -40 mV, en ausencia y presencia de WIN55,212-2 a la concentración de 1 μ M. La línea discontinua representa el nivel de corriente cero.

El WIN55,212-2 redujo ligeramente la amplitud del pico de corriente, pero indujo una fase rápida de caída de la corriente ($\tau_{inac}=36.2\pm6.9$ ms) sin modificar el proceso de inactivación ($\tau_{inac}=299.8\pm43.2$ ms), lo que disminuyó la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +60 mV en un $40.5\pm2.3\%$ ($P<0.05$ vs. control, $n=5$). Sin embargo, el WIN55,212-2 no modificó la cinética del proceso de deactivación (Tabla IV.5).

Resultados

A continuación se estudió la dependencia de voltaje del bloqueo producido por el WIN55,212-2 a la concentración de 1 μ M. En la Figura IV.36A se muestran familias de trazos de $I_{hKv1.5}$ en ausencia y en presencia de WIN55,212-2 (1 μ M), registradas tras aplicar el protocolo de pulsos que aparece en la parte superior.

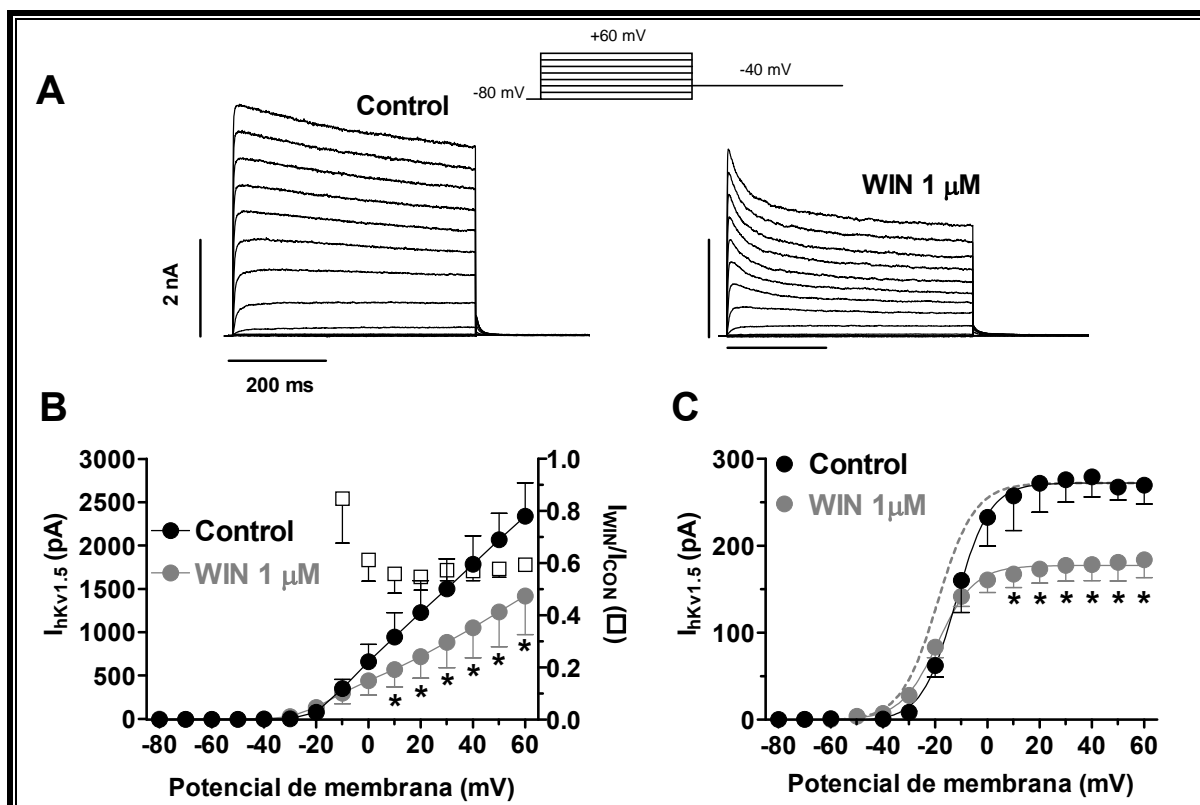


Figura IV.36. Efectos del WIN55,212-2 mediados a través del receptor CB₁ sobre la $I_{hKv1.5}$. (A) Familias de trazos de $I_{hKv1.5}$ obtenidas tras aplicar pulsos de 500 ms de duración desde -80 mV hasta potenciales entre -80 y +60 mV así como las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar la membrana a -40 mV en ausencia (panel de la izquierda) y en presencia (panel de la derecha) de WIN55,212-2 1 μ M. (B) Relaciones I-V de la $I_{hKv1.5}$ en situación control y en presencia de WIN55,212-2 1 μ M. Los cuadrados representan la corriente relativa calculada como el cociente de la amplitud de la corriente en presencia y en ausencia de WIN55,212-2. (C) Curvas de activación de los canales hKv1.5 en ausencia y en presencia de WIN55,212-2 1 μ M. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. La línea discontinua representa el ajuste de la curva en presencia de WIN55,212-2 normalizada respecto a la amplitud control. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de 5 experimentos. *P < 0.05 frente a valores control.

En la Figura IV.36B se representan las curvas I-V obtenidas al representar la amplitud de la corriente medida al final del pulso en función del potencial de membrana, en situación control y en presencia de WIN55,212-2 a la concentración de 1 μ M. El WIN55,212-2 inhibió la $I_{hKv1.5}$ de forma significativa a potenciales entre +10 y +60 mV (P < 0.05 vs. control, n=5), y más aun, el bloqueo inducido por el WIN55,212-2 aumentó marcadamente a potenciales de membrana comprendidos entre -20 y 0 mV, coincidiendo con el rango de potenciales de membrana a los cuales se produce la apertura del canal hKv1.5. Sin embargo, a potenciales más positivos de 0 mV el bloqueo no se veía modificado de forma significativa

Resultados

permaneciendo constante. A continuación se estudiaron sus efectos sobre la dependencia de voltaje de la activación del canal. La Figura IV.36C muestra las curvas de activación en ausencia y en presencia de WIN55,212-2 1 μ M, junto con el ajuste de una función de Boltzmann a los datos experimentales. Como se puede observar, el WIN55,212-2 disminuyó la amplitud de las corrientes de cierre y desplazó significativamente la curva de activación hacia potenciales más negativos sin modificar el valor de k . De hecho, en condiciones control y en presencia de WIN55,212-2, el valor de V_h fue -12.1 ± 2.3 mV y -19.1 ± 4.6 mV, respectivamente ($P < 0.05$, $n=5$, Tabla IV.5).

Cinética de inactivación	τ_{inac} (ms)	Cinética de deactivación	τ_r (ms)	τ_l (ms)
Control (CHO-CB1)	309.2 \pm 63.2	Control (CHO-CB1)	16.5 \pm 2.6	173.8 \pm 24.5
WIN	299.8 \pm 43.2	WIN	19.4 \pm 3.3	122.6 \pm 13.4
Control (<i>Ltk</i>)	216.7 \pm 32.1	Control (<i>Ltk</i>)	24.5 \pm 2.8	146.5 \pm 14.1
WIN	188.3 \pm 22.1	WIN	27.4 \pm 2.4	143.0 \pm 12.1
Dependencia de voltaje de la activación	V_h (mV)		k	
Control (CHO-CB1)	-12.1 ± 2.3		6.5 ± 0.6	
WIN	$-19.1 \pm 4.6^*$		6.1 ± 0.7	
Control (<i>Ltk</i>)	-16.4 ± 2.8		4.9 ± 0.8	
WIN	$-27.3 \pm 4.7^*$		5.1 ± 0.9	

Tabla IV.5. Efectos del WIN55,212-2 sobre las cinéticas de inactivación y de deactivación de $I_{hKv1.5}$ y sobre la dependencia de voltaje de activación de los canales $hKv1.5$ en células con y sin receptor CB_1 . τ_{inac} es la constante de tiempo obtenida del ajuste monoexponencial al trazo de corriente a +60 mV. τ_r y τ_l son las constantes de tiempo rápida y lenta obtenidas del ajuste de una ecuación biexponencial a los trazos de las corrientes de cierre. V_h y k son los valores de los puntos medios y las pendientes, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste de una ecuación de Boltzmann a las curvas de activación. Los datos representan la media \pm E.E.M. de ≥ 4 experimentos. * $P < 0.05$ frente a los valores control.

Para poder separar los efectos del WIN55,212-2 mediados a través del receptor CB_1 de los posibles efectos directos del compuesto sobre el canal $hKv1.5$, analizamos también los efectos del WIN55,212-2 sobre la $I_{hKv1.5}$ registrada en células que no expresaban el receptor CB_1 . En estas células, el WIN55,212-2 a la concentración de 1 μ M redujo la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +60 mV en un $42.7 \pm 3.9\%$ (Figura IV.37A), resultado muy similar al obtenido en las células CHO-CB1 y que indica que los efectos directos sobre los canales $hKv1.5$ son iguales que los efectos producidos por el WIN55,212-2 a través de receptor.

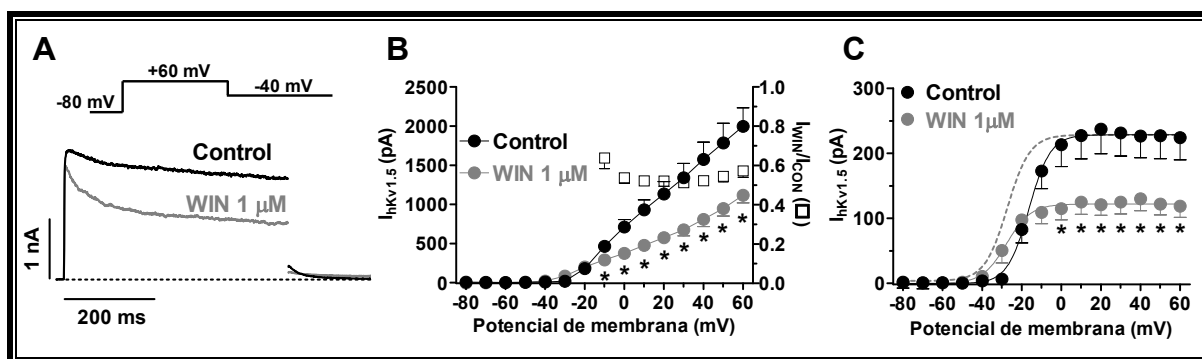


Figura IV.37. Efectos directos del WIN55,212-2 sobre la $I_{hKv1.5}$ registrada en células *Ltk*. (A) Trazos de $I_{hKv1.5}$ registrados tras aplicar un pulso de 500 ms de duración desde -80 mV hasta +60 mV así como las corrientes de cierre obtenidas al repolarizar la membrana a -40 mV en ausencia y en presencia de WIN55,212-2 1 μ M. (B) Relaciones I-V de la $I_{hKv1.5}$ en situación control y en presencia de WIN55,212-2 1 μ M. Los cuadrados representan la corriente relativa calculada como el cociente de la amplitud de la corriente en presencia y en ausencia de WIN55,212-2. (C) Curvas de activación de los canales hKv1.5 en ausencia y en presencia de WIN55,212-2 1 μ M. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. La línea discontinua representa el ajuste de la curva en presencia de WIN55,212-2 normalizada respecto a la amplitud control. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de 5 experimentos. *P < 0.05 frente a valores control.

En la representación de las relaciones I-V, se puede observar que el WIN55,212-2 1 μ M bloqueó significativamente el canal hKv1.5 a partir de potenciales más positivos de -20 mV y de nuevo, como en el caso de las células CHO-CB1, ese bloqueo era mayor a potenciales que comprenden la apertura del canal (entre -20 y 0 mV) (Figura IV.37B). En cuanto a los efectos directos del WIN55,212-2 1 μ M sobre la dependencia de voltaje de la activación del canal hKv1.5, de nuevo se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos en las células CHO-CB1. El WIN55,212-2 1 μ M, además de disminuir significativamente la amplitud de las corrientes de cierre, desplazó más de 10 mV la curva de activación hacia potenciales más negativos sin modificar el valor de k ($V_{hCONTROL} = -16.4 \pm 2.8$ mV y $V_{hWIN} = -27.3 \pm 4.7$ mV, $P < 0.05$, Tabla IV.4) (Figura IV.37C).

Puesto que los efectos del WIN55,212-2 a la concentración de 1 μ M sobre los canales hKv1.5 eran casi idénticos tanto en células con el receptor CB₁ como en células sin receptor, analizamos los efectos de distintas concentraciones de WIN55,212-2 sobre la $I_{hKv1.5}$ en ambos tipos de células. La Figura IV.38 muestra las curvas concentración-respuesta obtenidas al representar la disminución de la $I_{hKv1.5}$ medida al final del pulso a +60 mV en función de las distintas concentraciones empleadas. El ajuste de la ecuación de Hill (ecuación III.4) a los datos experimentales, fijando el n_H a la unidad y asumiendo un bloqueo máximo del 100%, permitió obtener los valores de CE_{50} para el WIN55,212-2 en células con el receptor CB₁ (1.4 ± 0.3 μ M) y en células sin receptor (1.2 ± 0.2 μ M). Como se puede observar los efectos son muy similares a todas las concentraciones estudiadas en ambos casos, y de hecho la

comparación de las curvas usando el test F, que tiene en cuenta los grados de libertad y la suma de los cuadrados, demostró que no eran significativamente distintas ($P > 0.05$).

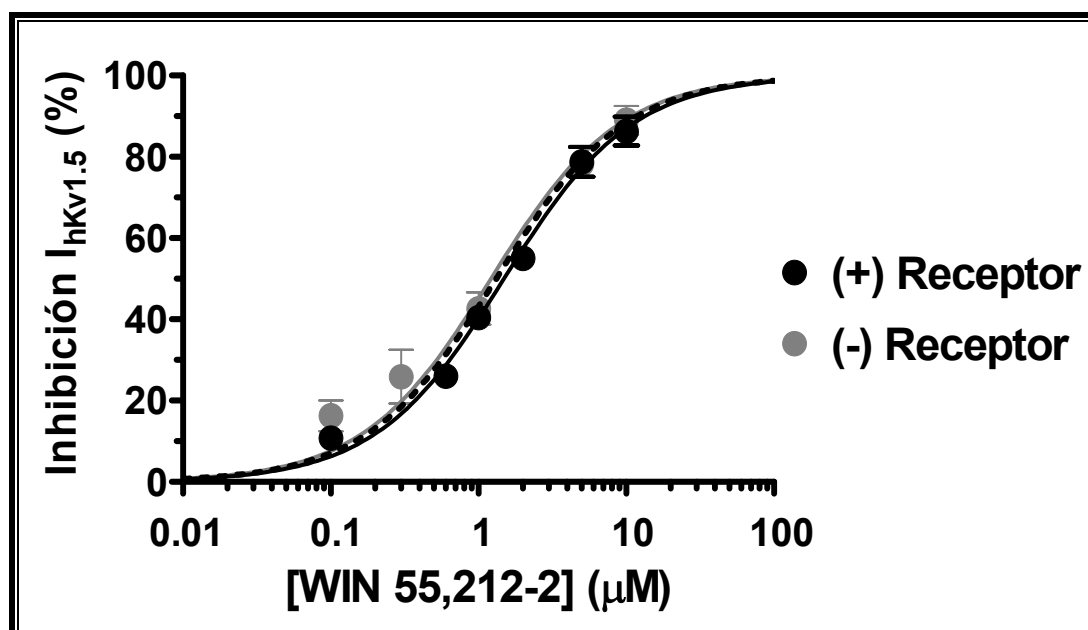


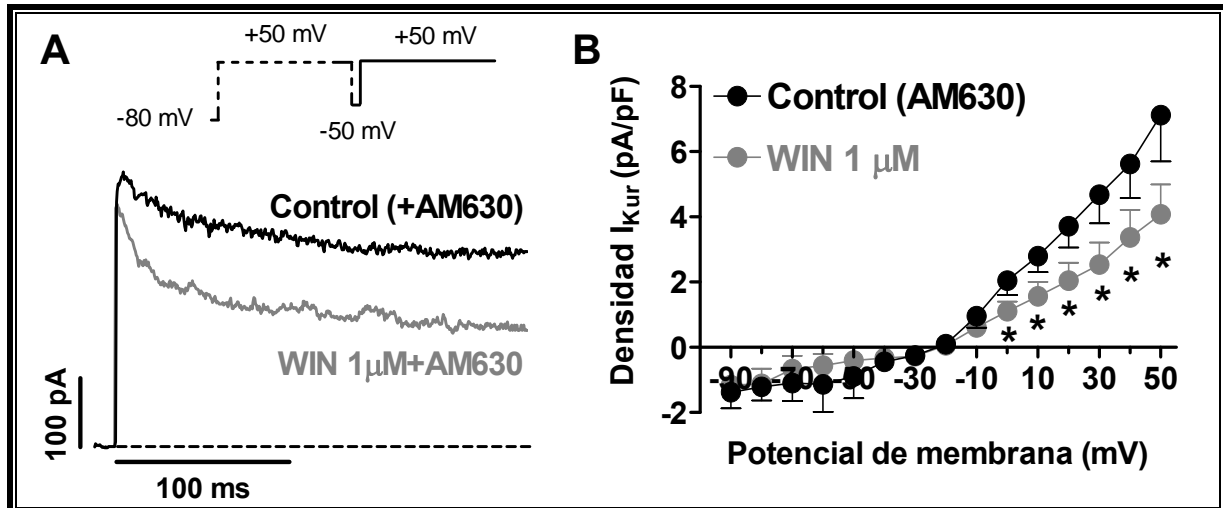
Figura IV.38. Curvas concentración-respuesta de los efectos del WIN55,212-2 sobre la $I_{hKv1.5}$. Representación de la reducción de la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +60 mV en función de las concentraciones de WIN55,212-2 estudiadas en células con receptor CB_1 (negro) y en células sin receptor (gris). Se utilizó una ecuación de Hill para el ajuste a los datos experimentales, fijando el n_H a la unidad y asumiendo un bloqueo máximo del 100%. La línea discontinua representa el ajuste común de todos los datos. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 4 experimentos.

Puesto que los efectos del WIN55,212-2 sobre la $I_{hKv1.5}$ son iguales al activar el receptor CB_1 que interaccionando de manera directa con el canal, este grupo de resultados indica que los canales $hKv1.5$ no son modulados por la activación del receptor CB_1 .

4.2.1 Efectos de la activación del receptor CB_1 sobre la corriente auricular humana I_{Kur}

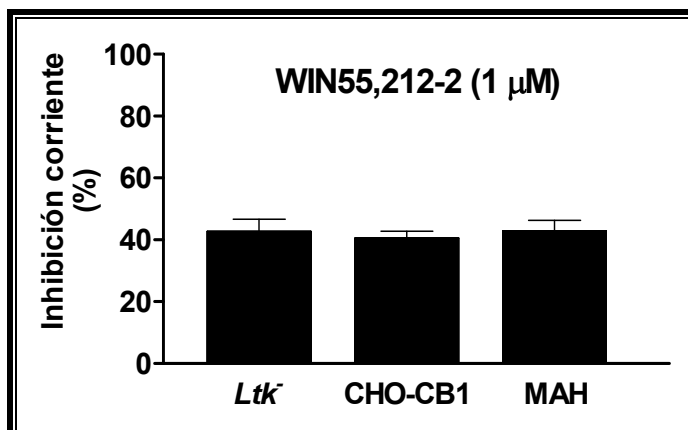
A continuación quisimos estudiar los posibles efectos mediados a través del receptor CB_1 sobre la corriente I_{Kur} generada en miocitos auriculares humanos.

En este grupo de experimentos la solución externa contenía AM630 (1 μM), un antagonista de receptores CB_2 . Sin embargo no se añadió ningún fármaco antagonista de receptores GPR55 ya que hasta el momento no existe ninguno que sea suficientemente selectivo (Kapur y cols., 2009). Para activar el receptor CB_1 se eligió de nuevo WIN55,212-2 pues carece de afinidad por los receptores GPR55 (Ryberg y cols., 2007; Lauckner y cols., 2008).



En la Figura IV.39A se muestran trazos de I_{Kur} registrados a +50 mV en situación control (con el antagonista CB₂, AM630, a la concentración de 1 μ M) y en presencia de WIN55,212-2. Como se puede observar, el WIN55,212-2 1 μ M redujo la amplitud de la I_{Kur} produciendo una inhibición al final del pulso del $42.9 \pm 3.4\%$ ($n=4$, $P < 0.05$), resultado casi idéntico al que producía el WIN55,212-2 sobre las corrientes generadas por los canales hKv1.5 expresados en líneas celulares. Si normalizamos la amplitud de la I_{Kur} al tamaño celular obtenemos la densidad de corriente, que aparece representada a los distintos potenciales ensayados tanto en ausencia como en presencia de WIN55,212-2 (Figura IV.39B). El WIN55,212-2 1 μ M inhibía significativamente la corriente a potenciales más positivos de -10 mV.

La Figura IV.40 muestra que WIN55,212-2 produce un mismo porcentaje de inhibición de la $I_{hKv1.5}$, tanto en células *Ltk* sin receptor CB1 como en células CHO-CB1, y de la I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos (MAH).



Los resultados obtenidos en este grupo de experimentos sugieren que la activación del receptor CB₁ por WIN55,212-2 1 μ M no modula la corriente nativa I_{Kur} en miocitos auriculares humanos.

4.3. Efectos de la estimulación selectiva del receptor GPR55 sobre la $I_{hKv1.5}$

Como se ha mencionado previamente, en diversos estudios se ha sugerido que en el aparato cardiovascular debe existir al menos otro receptor para endocannabinoides distinto al CB₁ y CB₂. Este receptor no-CB₁/no-CB₂ probablemente sea el receptor GPR55 (Baker y cols., 2006; Lauckner y cols., 2008; Waldeck-Weiermair y cols., 2008). Se trata de un receptor acoplado a proteínas G que puede ser activado por la AEA y el 2-AG y también por compuestos como la PEA aunque su ligando endógeno natural parece ser el LPI (Sawzdargo y cols., 1999; Baker y cols., 2006; Oka y cols., 2007; Pertwee, 2007; Ryberg y cols., 2007). En los resultados descritos en anteriores apartados (Apartado IV.2.2 y 2.3) se mostraba que ni el LPI ni la PEA ejercían efectos directos sobre los canales hKv1.5 por lo que estos compuestos eran una herramienta óptima para estudiar los posibles efectos mediados a través del receptor GPR55. Por lo tanto, a continuación se analizaron los efectos del LPI y la PEA sobre la $I_{hKv1.5}$ registrada en células CHO que expresaban de forma estable el receptor GPR55 (CHO-GPR55). En esta línea celular, la transfección transitoria del gen que codifica para los canales hKv1.5 daba lugar a corrientes con las mismas características cinéticas y voltaje-dependientes que las de la $I_{hKv1.5}$ registrada en células *Ltk*.

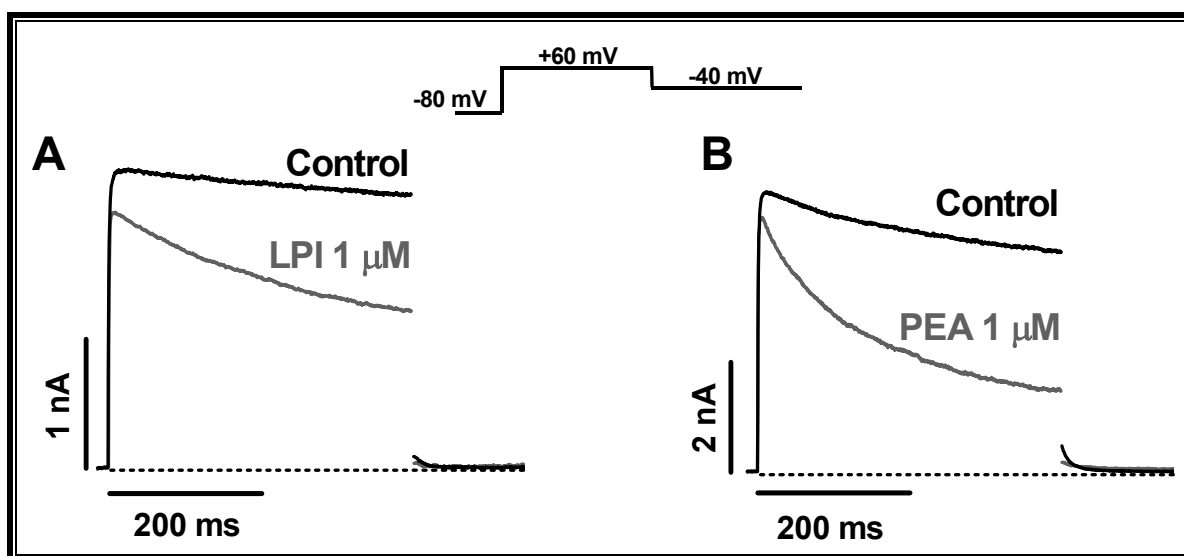


Figura IV.41. Efectos del LPI y la PEA sobre la $I_{hKv1.5}$ en células CHO-GPR55. Trazos de $I_{hKv1.5}$ registrados en células CHO-GPR55 tras aplicar pulsos de 500 ms de duración desde -80 hasta +60 mV, junto con las corrientes de cierre registradas al repolarizar la membrana a -40 mV, en ausencia y presencia de LPI (A) y de PEA (B) a la concentración de 1 μ M. Las líneas discontinuas representan el nivel de corriente cero.

Resultados

En la Figura IV.41 se muestran trazos representativos de $I_{hKv1.5}$ registrada en células CHO-GPR55, en situación control y en presencia de LPI (Panel A) y de PEA (Panel B), ambos a la concentración de 1 μ M. El LPI y la PEA redujeron la amplitud de la $I_{hKv1.5}$ medida al final del pulso a +60 mV en un $43.4 \pm 7.8\%$ y un $57.2 \pm 7.3\%$, respectivamente. Esta inhibición resultó ser significativamente mayor que la producida en ausencia de receptor GPR55. Además ambos compuestos aceleraron el proceso de inactivación disminuyendo significativamente el valor de τ_{inac} (obtenido del ajuste de una función monoexponencial al trazo de +60 mV) y por otro lado retrasaron el curso temporal de la deactivación aumentando significativamente los valores de τ_r y τ_l (obtenidos del ajuste de una función biexponencial a los trazos de las corrientes de cierre) (Tabla IV.6).

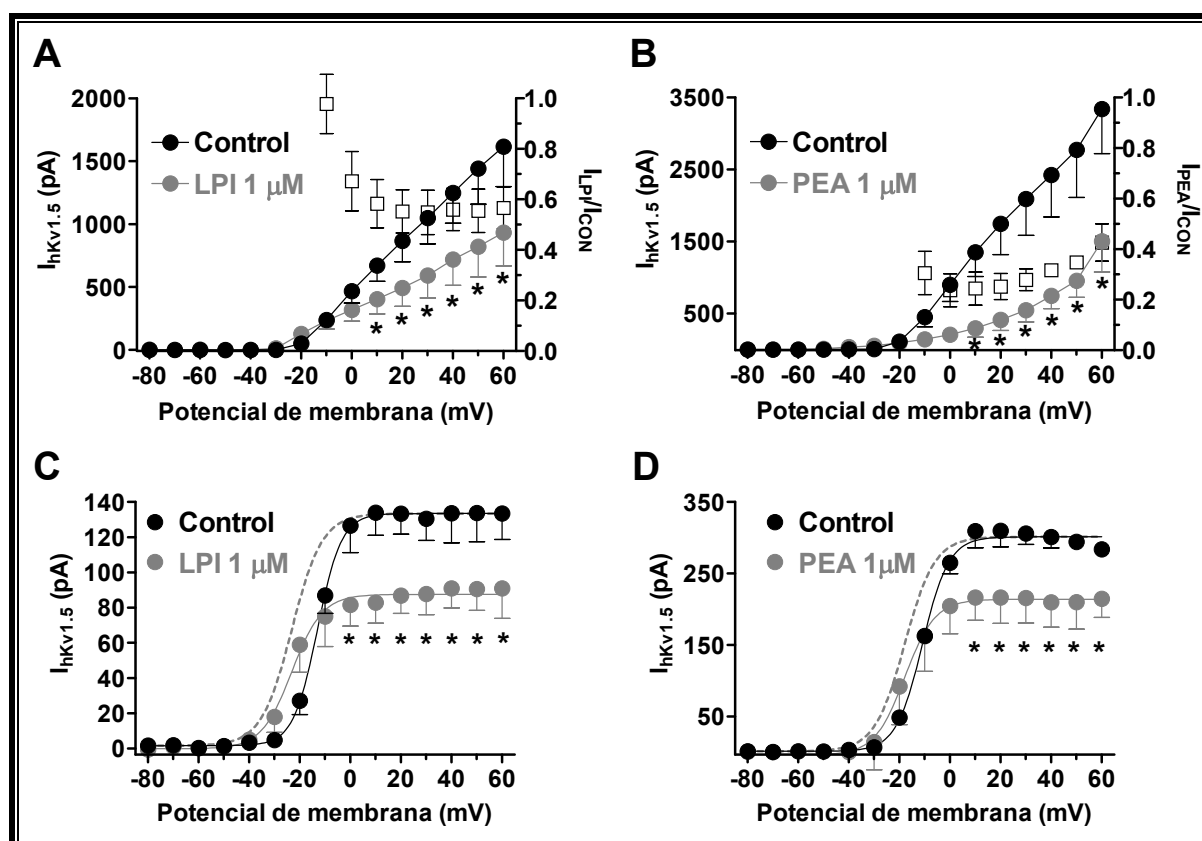


Figura IV.42. Efectos del LPI y la PEA sobre la $I_{hKv1.5}$ en células CHO-GPR55. (A-B) Relaciones I-V en situación control (círculos negros) y en presencia de LPI (A) y PEA (B) a la concentración de 1 μ M (círculos grises). Los cuadrados representan la corriente relativa calculada como el cociente de la amplitud de la corriente en presencia y en ausencia de cada compuesto. **(C-D)** Curvas de activación de los canales hKv1.5 en ausencia y en presencia de LPI (C) y PEA (D) a la concentración de 1 μ M. Las líneas continuas representan el ajuste de una ecuación de Boltzmann a los datos experimentales. Las líneas discontinuas representan el ajuste de la curva en presencia de cada compuesto normalizadas respecto a la amplitud control. * $P < 0.05$ frente a datos control. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 4 experimentos.

A continuación se representaron las relaciones I-V en situación control y en presencia de cada compuesto y posteriormente se analizaron los efectos sobre la dependencia de voltaje de

Resultados

la activación del canal. Como se puede observar en la Figura IV.42A y B, tanto el LPI como la PEA reducían la $I_{hKv1.5}$ de forma significativa a potenciales entre +10 y +60 mV y además ese bloqueo aumentaba a potenciales comprendidos entre -20 y 0 mV para permanecer constante a potenciales más positivos. Por otro lado, ambos compuestos reducían significativamente la amplitud de las corrientes de cierre registradas a -40 mV y desplazaban la curva de activación hacia potenciales más negativos sin modificar el valor de k (Figura 42C y D, Tabla IV.6).

Cinética de inactivación	τ_{inac} (ms)	Cinética de deactivación	τ_r (ms)	τ_l (ms)
Control	292.4±60.6	Control	14.1±2.9	75.7±17.5
LPI	176.8±38.5**	LPI	19.6±3.4*	124.9±21.1**
Control	269.1±23.5	Control	14.8±1.7	60.4±6.3
PEA	221.2±46.2*	PEA	24.8±2.0*	133.8±35.8*
Dependencia de voltaje de la activación	V_h (mV)		k	
Control	-14.2±3.5		4.4±0.2	
LPI	-23.8±5.4**		6.0±0.7	
Control	-11.1±0.8		4.5±0.6	
PEA	-17.2±2.0*		6.2±0.4	

Tabla IV.6. Efectos del LPI y la PEA sobre las cinéticas de inactivación y de deactivación y sobre la dependencia de voltaje de la activación de los canales hKv1.5 expresados en células CHO-GPR55. τ_{inac} es la constante de tiempo obtenida del ajuste monoexponencial al trazo de corriente a +60 mV. τ_r y τ_l son las constantes de tiempo rápida y lenta obtenidas del ajuste de una ecuación biexponencial a los trazos de las corrientes de cierre. V_h y k son los valores de los puntos medios y las pendientes, respectivamente, obtenidos mediante el ajuste de una ecuación de Boltzmann a las curvas de activación. Los datos representan la media±E.E.M. de ≥ 4 experimentos. * y ** son $P < 0.05$ y $P < 0.01$, respectivamente, frente a los valores control.

Al representar la inhibición de $I_{hKv1.5}$ a +60 mV en función de las distintas concentraciones de LPI y PEA empleadas, se obtuvieron las curvas concentración-respuesta para cada compuesto (Figura IV.43A y C). El ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales nos permitió obtener los valores de CE_{50} , que fueron de $1.4 \pm 0.2 \mu M$ para el caso del LPI y de $0.1 \pm 0.01 \mu M$ para el caso de la PEA. Además de las curvas concentración-respuesta, en la Figura IV.43A y C se representa también la inhibición no mediada por receptor de la $I_{hKv1.5}$ producida por el LPI y la PEA, respectivamente. Tal y como se había descrito en el apartado IV.2.2 y 2.3 de la presente Tesis Doctoral, no fue posible realizar el ajuste de la ecuación de Hill a dichos datos experimentales, pues el bloqueo máximo obtenido a la máxima concentración empleada apenas alcanzaba el 30%.

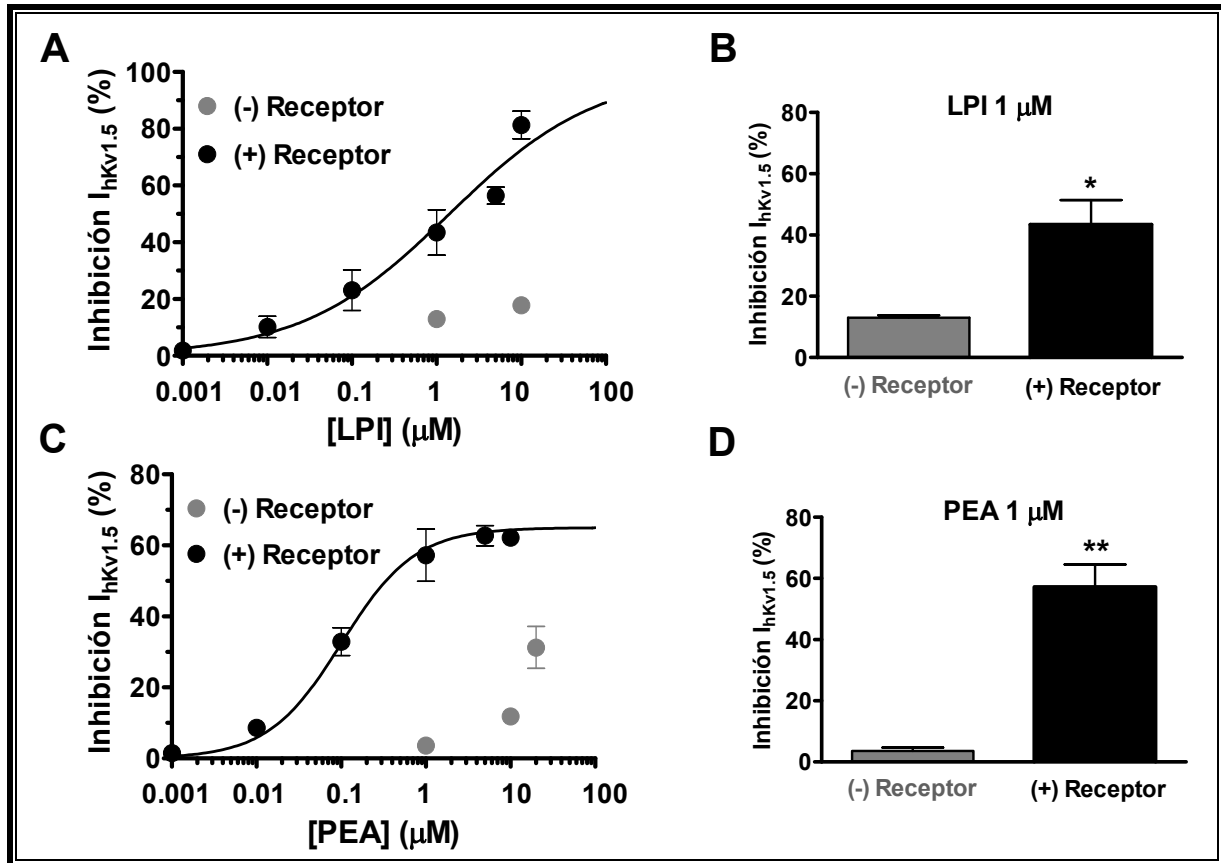


Figura IV.43. Curvas concentración-respuesta de los efectos del LPI y la PEA sobre la $I_{hKv1.5}$. (A y C) Representación de la reducción de la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +60 mV en función de las concentraciones de LPI (A) y PEA (C) estudiadas en células con receptor GPR55 (círculos negros) y en células sin receptor (círculos grises). Las líneas continuas representan el ajuste de la ecuación de Hill a los datos experimentales, fijando el n_H a la unidad y asumiendo un bloqueo máximo del 100%. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de ≥ 4 experimentos. (B y D) Porcentaje de bloqueo de los canales hKv1.5 producido por el LPI (B) y la PEA (D) a la concentración de 1 μ M en ausencia (barra gris) y en presencia (barra negra) del receptor GPR55. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ frente a datos obtenidos en células sin receptor.

Sin embargo, sí que pudimos comparar el bloqueo producido por ambos compuestos a la concentración de 1 μ M, tanto de manera directa como a través del receptor GPR55. Como se puede observar en la Figura IV.43B y D, el bloqueo de los canales hKv1.5 inducido tanto por el LPI como por la PEA es significativamente mayor cuando está mediado a través de receptor que de manera directa. De hecho, para el LPI el bloqueo pasa de un $12.9 \pm 0.8\%$ en células sin receptor a un $43.4 \pm 7.9\%$ en células con el receptor GPR55. Del mismo modo el bloqueo de la PEA aumenta de un $3.6 \pm 1.1\%$ en células sin receptor a un $57.2 \pm 7.3\%$ en las células que si tienen receptor.

El hecho de que en presencia del receptor GPR55, el LPI y la PEA sean mucho más potentes para bloquear los canales hKv1.5 y de que además sean capaces de desplazar significativamente la curva de activación hacia potenciales más negativos, efecto que no se observaba en las células sin receptor (Apartado IV.2.2 y 2.3), sugiere que la $I_{hKv1.5}$ puede ser

modulada por el receptor GPR55 cuando éste es estimulado por agonistas endógenos como el LPI o la PEA.

4.3.1 Efectos de la activación del receptor GPR55 sobre la corriente auricular humana I_{Kur}

A continuación analizamos los posibles efectos producidos sobre la corriente I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos mediados tras la estimulación del receptor GPR55 mediante el LPI y la PEA. En este grupo de experimentos, la solución externa contenía AM630, antagonista CB_2 , y AM281, antagonista de receptores CB_1 , ambos a la concentración de 1 μM . En este caso descartamos la utilización de RMB puesto que se ha descrito que es agonista del receptor GPR55 (Kapur y cols., 2009).

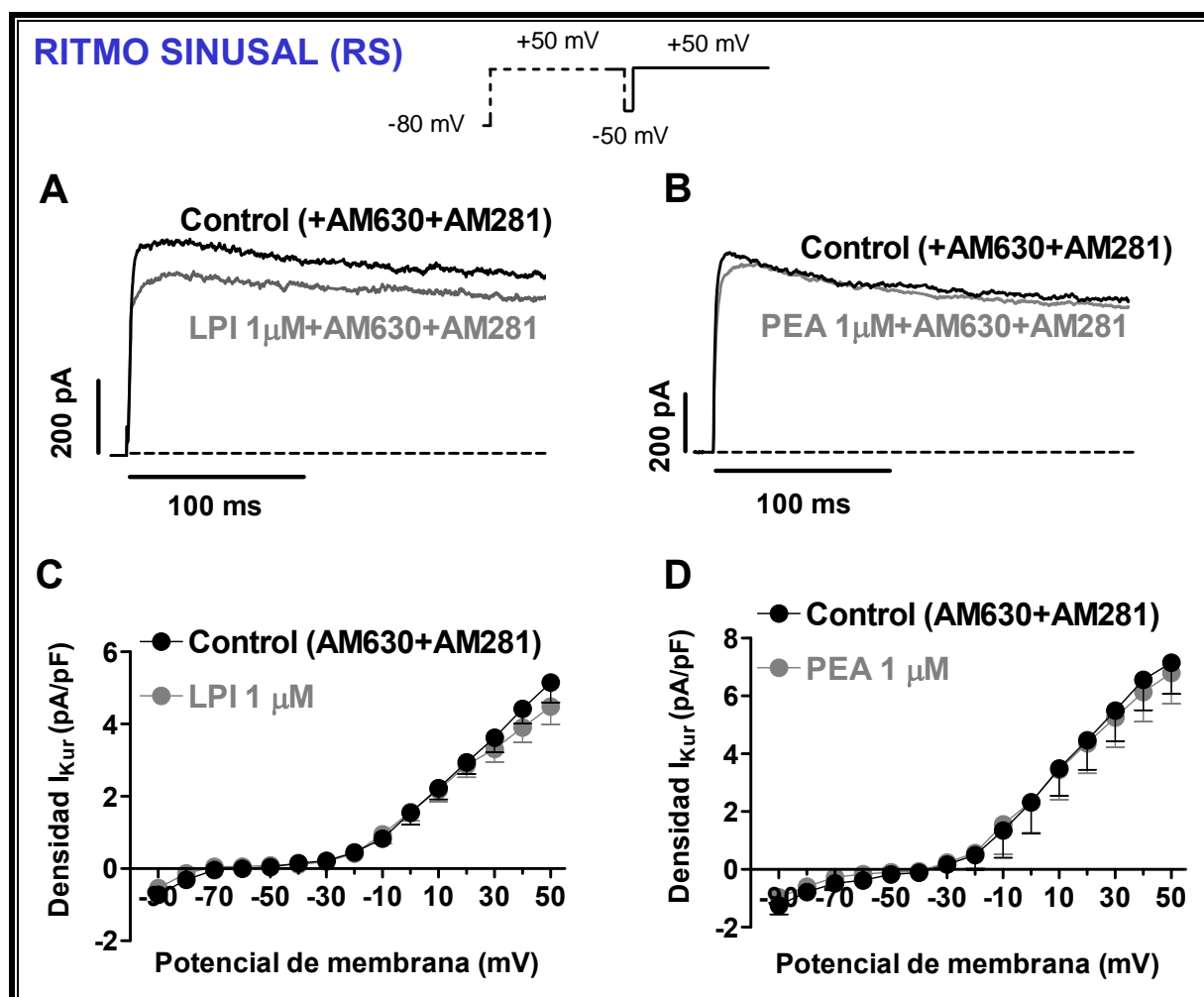


Figura IV.44. Efectos del LPI y la PEA sobre la corriente auricular humana I_{Kur} en RS. (A-B) Trazos de corriente auricular humana I_{Kur} registrados a +50 mV tras un prepulso de 200 ms a +50 mV en presencia de AM630 y AM281 (ambos a la concentración de 1 μM) en ausencia y en presencia de LPI (A) y PEA (B) 1 μM . (C-D) Relaciones densidad-voltaje para la I_{Kur} en ausencia y presencia de LPI (C) y PEA (D) 1 μM . Cada punto representa la media \pm E.E.M. de $n \geq 6$ experimentos.

La Figura IV.44A y B muestra trazos de I_{Kur} registrados al aplicar el protocolo de pulsos que aparece en la parte superior de la figura. Éste consistía en un prepulso de 200 ms a +50 mV desde un potencial de fijación de -80 mV para inactivar la I_{to} , seguido de un segundo pulso de 500 ms a +50 mV donde se conseguía registrar la I_{Kur} . Como se puede observar, la aplicación de LPI (panel A) y PEA (panel B) a la concentración de 1 μ M redujo ligeramente la amplitud de la corriente medida al final del pulso a +50 mV, resultando en una inhibición de la corriente de un $12.8 \pm 3.4\%$ y $5.1 \pm 1.0\%$ para el LPI y la PEA, respectivamente ($n \geq 6$, $P > 0.05$).

Al representar la densidad de la I_{Kur} a los distintos potenciales ensayados obtenemos las relaciones densidad-voltaje, que aparecen representadas en la Figura IV.44C y D tanto en situación control como en presencia de LPI y PEA 1 μ M. Ninguno de los dos compuestos inhibió significativamente la corriente a ninguno de los potenciales estudiados.

Los resultados sugieren que los efectos producidos por la estimulación del receptor GPR55 sobre la I_{Kur} en miocitos auriculares humanos procedentes de pacientes en RS son menos marcados que los producidos sobre la $I_{hKv1.5}$ en células CHO-GPR55.

A continuación y puesto que habíamos descrito un aumento en el ARNm de los receptores GPR55 en las muestras auriculares obtenidas de pacientes con FAC (Figura IV.33 y IV.34) decidimos estudiar los efectos del LPI y la PEA sobre la I_{Kur} registrada en miocitos procedentes de pacientes con FAC.

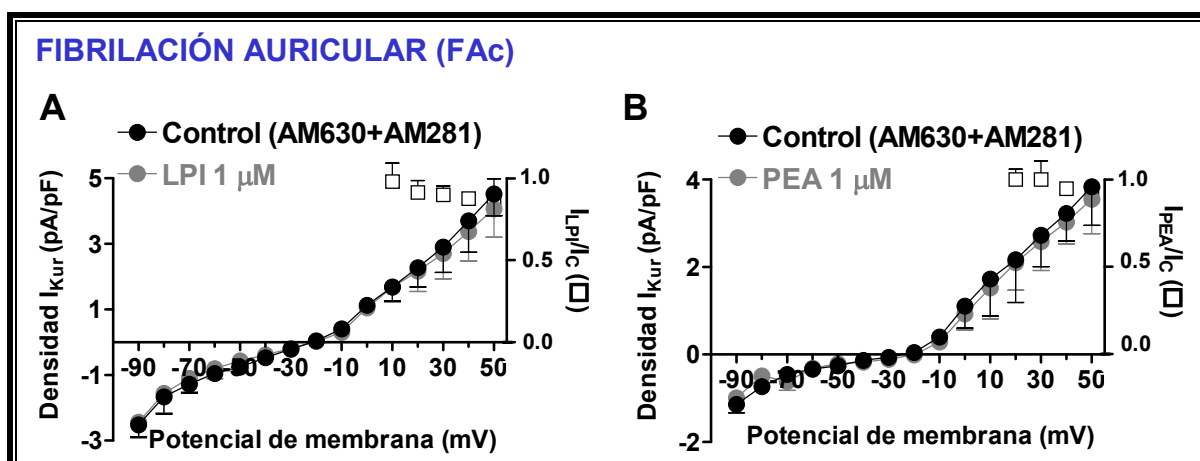


Figura IV.45. Efectos del LPI y la PEA sobre la corriente auricular humana I_{Kur} en FAC. (A-B) Relaciones densidad-voltaje para la I_{Kur} en ausencia y presencia de LPI (A) y PEA(B) 1 μ M. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de $n \geq 4$ experimentos.

En la Figura IV.45A y B aparecen representadas las relaciones densidad-voltaje tanto en situación control como en presencia de LPI (A) y PEA (B) a la concentración de 1 μ M. Como se puede observar ninguno de los compuestos aplicados produjo una inhibición significativa a

ninguno de los potenciales ensayados ($n \geq 4$, $P > 0.05$). De hecho a +50 mV redujeron la amplitud de la corriente en un $10.4 \pm 3.1\%$ en el caso del LPI y en un $9.8 \pm 2.4\%$ en el caso de la PEA. Ambos resultados no resultaron ser significativamente distintos a los obtenidos en la I_{Kur} registrada en miocitos procedentes de pacientes en RS ($P > 0.05$).

Estos resultados, tanto en condiciones de RS como de FAC, son similares a los obtenidos al estudiar los efectos de ambos compuestos sobre los canales hKv1.5 expresados en líneas celulares sin receptor GPR55 (Apartado IV.2.2 y 2.3). Por lo tanto, este último grupo de resultados parece sugerir que la corriente nativa I_{Kur} no es modulada por la activación del receptor GPR55 ni en condiciones fisiológicas ni patológicas, a pesar de que dichos receptores parecen estar presentes en los miocitos auriculares humanos y que su expresión está aumentada en FAC.

V. DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral se ha demostrado que los endocannabinoides AEA y 2-AG, así como el análogo de endocannabinoides OEA, bloquean de forma independiente de receptor los canales cardiacos hKv1.5 expresados en líneas celulares de mamífero. Sin embargo, los endocannabinoides PEA y LPI son menos potentes para bloquear estos canales. Dicho bloqueo se produce como consecuencia de la interacción directa entre los endocannabinoides y el canal hKv1.5, al cual se unen en su cara externa en la misma región en la que se une el TEA. Además, los datos obtenidos demuestran que los endocannabinoides inhiben de forma independiente de receptor la corriente nativa I_{Kur} en miocitos auriculares humanos, confirmando así los datos obtenidos sobre los canales clonados expresados en líneas celulares.

También hemos demostrado en muestras de orejuela auricular procedentes de pacientes, que la FAC produce un aumento de la expresión del ARNm de los receptores de endocannabinoides CB₁, CB₂ y GPR55. Sin embargo, la corriente nativa I_{Kur} no parece ser modulada por la activación de los receptores CB₁ ni por la activación de los receptores GPR55.

1. EFECTOS DE LOS ENDOCANNABINOIDES SOBRE LOS CANALES hKv1.5 Y LA I_{Kur}

Las células auriculares, pero no las ventriculares, presentan una corriente de salida de K⁺ que se activa en el rango de potenciales de la fase de meseta del PA y que presenta rectificación y una lenta inactivación, y que se denomina corriente rectificadora tardía de activación ultrarrápida o I_{Kur} (Snyders y cols., 1993; Wang y cols., 1993; Amos y cols., 1996; Feng y cols., 1998a). Los canales Kv1.5 son los responsables de generar esta corriente en la aurícula humana (Nattel y cols., 1999a).

Los efectos inhibitorios producidos por los endocannabinoides sobre los canales hKv1.5 expresados en líneas celulares de mamífero y descritos en esta Tesis Doctoral, no pueden atribuirse a la activación de los receptores CB₁ y CB₂. Esta afirmación se apoya en los experimentos de Western blot y de qPCR en tiempo real en los que se demostró que nuestras células *Ltk* no expresan de manera endógena receptores CB₁ ni CB₂. De hecho, el bloqueo producido por la AEA no fue abolido en presencia de un antagonista selectivo de receptores CB₁ (RMB) ni en presencia de un antagonista selectivo de receptores CB₂ (AM630). Por lo tanto, puede asumirse que los efectos observados son efectos directos de los endocannabinoides sobre los canales cardíacos hKv1.5. La AEA y el 2-AG pueden

considerarse como potentes bloqueantes de los canales hKv1.5 puesto que en ambos casos los valores de CE_{50} se encuentran en el rango micromolar bajo. De hecho, nuestros resultados con AEA y 2-AG son similares a los obtenidos por otros grupos para el bloqueo de canales iónicos no cardíacos (Pertwee y cols., 2010; Oz, 2006; Bondarenko y cols., 2010) como por ejemplo los canales TASK-1 ($CE_{50}=0.7 \mu M$) (Maingret y cols., 2001), los de Ca^{2+} tipo T ($CE_{50}= 0.33 \mu M$) (Chemin y cols., 2001) o los canales Kv1.2 ($CE_{50}=2.7 \mu M$) (Poling y cols., 1996). Por otro lado, la AEA es más potente para bloquear los canales cardíacos hKv1.5 que para bloquear los canales de Na^{+} ($CE_{50}= 5.5 \mu M$) de las neuronas ganglionares de la raíz dorsal de ratas (Kim y cols., 2005). En todos estos estudios los efectos de los endocannabinoides tampoco estaban mediados por receptores.

Los efectos descritos sobre los canales hKv1.5 expresados en líneas celulares de mamífero se reproducían tanto cualitativa como cuantitativamente cuando se registraba la I_{Kur} en miocitos auriculares humanos. Por tanto, los resultados demuestran que la AEA inhibe de forma independiente de receptor la corriente nativa con una potencia similar a la inhibición que observábamos sobre la $I_{hKv1.5}$. La inhibición de $I_{hKv1.5}$ y de la I_{Kur} producida por la AEA y el 2-AG, aumentaría la altura y la duración de la fase de meseta del PA auricular humano, efectos que han sido propuestos como críticos para el cese de las fuentes de reentrada sostenida de alta frecuencia (rotores) que pueden ser responsables de la FA (Pandit y cols., 2005). Por ello se analizaron los efectos de AEA a la concentración de $1 \mu M$ sobre los PA auriculares de ratón. Se eligió esta especie porque la I_{Kur} está generada por los canales Kv1.5 (Nerbonne y Kass, 2005). Los experimentos se realizaron en presencia de antagonistas para CB_1 y CB_2 para poder estudiar sólo los efectos directos de la AEA sobre las características del PA. La AEA prolongó la fase de meseta, medida al 20% de la repolarización, en un 25%. Es más, también prolongó significativamente la DPA medida al 50% y al 90% de la repolarización. Estos últimos efectos se podrían deber a efectos adicionales producidos directamente por la AEA sobre otras corrientes de K^{+} repolarizantes específicas de la aurícula de ratón. Por lo tanto serían necesarios más estudios sobre los efectos de los endocannabinoides en otros canales iónicos cardíacos humanos para determinar los verdaderos efectos fisiológicos de los endocannabinoides sobre la actividad eléctrica de la aurícula humana.

También se han analizado los efectos de determinados ácidos grasos (en particular de aquellos que se relacionan estructuralmente con los endocannabinoides y análogos de endocannabinoides estudiados) sobre los canales hKv1.5 como herramienta para obtener una información más precisa acerca de una posible relación estructura-actividad de los efectos

observados con los endocannabinoides. Los resultados demuestran que el AO y el AA son bloqueantes de los canales hKv1.5 bastante potentes, coincidiendo con estudios previos que demuestran que los ácidos grasos poliinsaturados, en especial el AA, pueden modular la actividad de canales de Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} (Honoré y cols., 1994; Villarroel y Schwartz, 1996; Xiao y cols., 1997; Holmqvist y cols., 2001; Guizy y cols., 2008; Amorós y cols., 2010). La hidrólisis de AEA libera AA por lo que se podría pensar que el bloqueo producido por la AEA podría deberse a su metabolito. Sin embargo, la MetAEA (el análogo no hidrolizable de la AEA) bloquea los canales hKv1.5 con la misma potencia que la AEA, lo que sugiere que los efectos descritos son producidos por la AEA y no por su metabolito.

Los resultados demuestran que los ácidos grasos son más potentes bloqueando los canales hKv1.5 que sus correspondientes etanolamidas, con la excepción del AA y la AEA. Más aun, el bloqueo no parece que esté relacionado con la liposolubilidad de cada compuesto. Por el contrario, nuestros resultados sugieren que a medida que la complejidad y el número de carbonos de la cadena de acilo aumentan (por lo menos entre 16 y 20 carbonos), la potencia de bloqueo aumenta. Esa dependencia en el número de carbonos de la cadena también había sido observada previamente en un estudio sobre el bloqueo producido por alcoholes sobre la I_A registrada en neuronas de *Aplysia* (Treistman and Wilson, 1987). La excepción a esta regla general parece ser el AA, que fue mucho menos potente de lo esperado teniendo en cuenta su longitud y la presencia de cuatro insaturaciones en su cadena. Así, el hecho de que la potencia de bloqueo dependa de algunos parámetros de la estructura del compuesto, sugiere que los efectos son debidos a la interacción específica con un sitio de unión localizado en la proteína del canal y capaz de reconocer este tipo de moléculas.

En varios estudios se ha postulado que los endocannabinoides y los ácidos grasos, ya sean saturados o no, pueden modificar la actividad de algunos canales mediante la alteración de propiedades de la membrana como la fluidez, la rigidez de la bicapa lipídica o la curvatura (Bruno y cols., 2007). Por el contrario, otros estudios han demostrado que mediadores lipídicos como el AA y otros ácidos grasos poliinsaturados no modifican las propiedades de la membrana, al menos a concentraciones a las que esos compuestos inhiben las corrientes cardíacas (Pound y cols., 2001). Para averiguar si esos efectos inespecíficos pueden afectar al bloqueo observado en nuestras condiciones experimentales, se realizó una caracterización estructural y dinámica de la membrana celular en ausencia y en presencia de los endocannabinoides, análogos de endocannabinoides y ácidos grasos estudiados. Este análisis se realizó mediante el uso de una sonda lipofílica fluorescente con una cabeza polar aniónica (PA-DPH). La medida de la anisotropía de fluorescencia de la sonda ofrece información

semicuantitativa para comparar la fluidez de las membranas celulares bajo diferentes condiciones experimentales (Mateo y cols., 1993; Guizy y cols., 2008). Así, el análisis de los experimentos realizados no descartó la posibilidad de que los endocannabinoides modifiquen el orden y la microviscosidad de la membrana. Sin embargo, sí demostraron que los efectos producidos por todos los compuestos estudiados sobre las propiedades de la membrana eran los mismos, lo cual contrasta con la diferente potencia que exhiben para bloquear los canales hKv1.5. Estos resultados sugieren que estos compuestos estarían interaccionando de una forma directa con el canal. Además, el hecho de que la AEA y el 2-AG (endocannabinoides derivados del AA con 20 átomos de carbono) bloqueen el canal hKv1.5 con la misma potencia, que a su vez es significativamente mayor que la del LPI y la PEA (que poseen cadenas acilo de 16-18 átomos de carbono), añade más consistencia a la hipótesis de que exista un sitio de unión en el canal que reconozca este tipo de moléculas. Del mismo modo, tampoco se vio una relación directa entre la potencia de bloqueo sobre los canales hKv1.5 y la liposolubilidad de etanolamidas y ácidos grasos utilizando sus índices de partición y distribución, respectivamente. Por tanto, estos resultados vuelven a sugerir que estos compuestos inhiben la corriente interaccionando directamente con el canal hKv1.5 y no produciendo cambios inespecíficos en las propiedades de la membrana.

Se ha descrito en numerosas ocasiones que los ligandos endocannabinoides inducen un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Díaz-Laviada y Ruiz-Llorente, 2005). Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ modulan diversas vías de señalización que podrían estar modificando la $I_{hKv1.5}$. Incluyendo BAPTA en la solución interna se inmoviliza de manera muy eficaz el Ca^{2+} intracelular (Stern, 1992) y así, en este grupo de experimentos, pudimos comprobar que los efectos de la AEA eran iguales que cuando se usaba EGTA. Por otro lado, se sabe que la AEA es capaz de regular multitud de enzimas, entre ellas la PKC (De Petrocellis y cols., 1995), y también se ha descrito que los efectos sobre los canales K_{ATP} producido por ácidos grasos se deben a la acción indirecta de isoformas de PKC sensibles a ácidos grasos (Müller y cols., 1992). Sin embargo, en el caso de los canales hKv1.5, este mecanismo fue descartado tras analizar los efectos de la AEA en presencia de estaurosporina, un inhibidor de la PKC. Por tanto, este grupo de datos apoyan de nuevo la hipótesis del efecto directo que estos compuestos producen sobre el canal hKv1.5.

2. DETERMINACIÓN DEL POSIBLE SITIO DE UNIÓN DE LOS ENDOCANNABINOIDES AL CANAL hKv1.5

Estudios previos han demostrado que la AEA bloquea los canales Kv1.2, Kv3.4 y Kv4.3 desde la cara extracelular de la membrana (Poling y cols., 1996; Oliver y cols., 2004; Amorós y cols., 2010), mientras que el bloqueo de los canales de Ca^{2+} tipo T se produce desde el lado intracelular (Chemin y cols., 2001). El bloqueo de los canales hKv1.5 producido por la AEA sólo se observaba cuando el compuesto era aplicado en la solución externa y además no era modificado por la presencia de AEA en el medio intracelular, lo que sugería un posible sitio de unión en la cara extracelular del canal hKv1.5. Para tratar de determinar dicho sitio de unión, estudiamos los efectos de la AEA en presencia de TEA aplicado en la solución externa. En estas condiciones, el bloqueo producido por la AEA era significativamente menor. El hecho de que la combinación de ambos compuestos produzca un bloqueo menor que el que se produce en presencia de la AEA sola, sugiere que la AEA y el TEA compiten por la unión al canal y que se unen o bien al mismo sitio o bien a sitios próximos entre sí. El residuo R487 de los canales hKv1.5 se encuentra situado en la entrada externa del poro y es el equivalente al que confiere la sensibilidad al TEA en los canales *Shaker* (MacKinnon y Yellen, 1990). Nuestros resultados demuestran que la AEA y el 2-AG producen un bloqueo significativamente menor en los canales R487Y que en los canales WT, lo que refuerza la hipótesis de que los efectos producidos por la AEA y el 2-AG se deben a una interacción directa con la cara externa del canal hKv1.5. La interacción directa de etanolamidas y ácidos grasos con las proteínas de canales ya se había descrito anteriormente (Honoré y cols., 1994; Poling y cols., 1996; Xiao y cols., 1997, 2001; Chemin y cols., 2001; Maingret y cols., 2001; Oliver y cols., 2004; Van der Stelt y Di Marzo, 2005; Kim y cols., 2005; Oz, 2006; Guizy y cols., 2008; Amorós y cols., 2010). De hecho, se ha descrito que una sola mutación en el D1-S6 de la subunidad α del canal de Na^+ de miocardio humano afecta al bloqueo producido por los ácidos grasos (Xiao y cols., 2001).

Asumiendo la existencia de un sitio de unión para endocannabinoides en la cara extracelular del canal hKv1.5, es difícil entender por qué la aparición del bloqueo es tan lenta y por qué el bloqueo es tan persistente incluso después de largos periodos de lavado con solución carente de compuesto. Sin embargo, este comportamiento es similar al observado con AEA en los canales de Na^+ , Kv1.2 y TASK-1 (Maingret y cols., 2001; Kim y cols., 2005; Oliver y cols., 2004). Los endocannabinoides y análogos de endocannabinoides se sitúan en la bicapa lipídica y se aproximan hasta sus sitios de acción (incluso a los propios receptores

CB₁, que están orientados hacia el exterior de la membrana) por difusión lateral (Makriyannis y cols., 2005). Los endocannabinoides difundirían lentamente por la membrana hasta llegar a la porción extracelular del canal hKv1.5, lo cual podría ser la causa de la lenta aparición y desaparición de los efectos. La información que existe sobre las propiedades conformacionales de la AEA en la membrana es controvertida. Sin embargo, muchos estudios localizan el grupo etanolamida cerca de la interfase, permitiendo la interacción entre este grupo y el residuo K192 del receptor CB₁ situado en la porción extracelular (Song y Bonner, 1996). Es importante destacar que nuestros resultados demuestran que el residuo crítico para el bloqueo de los canales hKv1.5 por parte de la AEA y el 2-AG también es un residuo cargado positivamente (R487).

Los resultados sugieren que la transición del canal hKv1.5 al estado abierto promueve el bloqueo producido por la AEA y el 2-AG. De hecho, el bloqueo aumenta en el rango de potenciales en los que se abre el canal, la AEA y el 2-AG aceleran la caída de la corriente durante la aplicación de pulsos despolarizantes y además retrasan el proceso de deactivación. Todas estas características del bloqueo concuerdan perfectamente con las características de aquellos bloqueantes de estado abierto de canales de K⁺ que acceden hasta el poro, desde la parte intracelular, cuando el canal se abre (Carmeliet y cols., 1998). Sin embargo, los resultados también sugieren que el sitio de unión de la AEA y el 2-AG es el mismo o solapa con el sitio de unión del TEA, que se encuentra en la parte extracelular del poro. Con los resultados obtenidos se puede hipotetizar que el aparente bloqueo de estado abierto no depende del acceso a su sitio receptor cuando el canal se abre sino que dependería de la afinidad preferente por el sitio receptor cuando se abre el canal. Serían necesarios más experimentos para determinar con seguridad el mecanismo de bloqueo de los endocannabinoides.

3. EFECTOS DE LOS ENDOCANNABINOIDES Y ANÁLOGOS MEDIADOS A TRAVÉS DE LA ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES CB SOBRE LA $I_{hKv1.5}$ Y LA I_{Kur}

Existen diversos estudios que analizan la relación del SCE con el aparato cardiovascular, sin embargo, se conoce muy poco acerca de los efectos que la modulación de este sistema puede ejercer sobre la actividad eléctrica cardíaca. Tras haber comprobado que en tejido auricular humano podemos encontrar ARNm de los receptores y mediadores del SCE, se

analizaron los posibles efectos electrofisiológicos de la activación de este sistema sobre la corriente $I_{hKv1.5}$ y la corriente nativa I_{Kur} .

3.1. Modulación de la $I_{hKv1.5}$ y de la I_{Kur} a través de la estimulación del receptor CB_1

En lo que respecta a su capacidad para estimular los receptores CB_1 , el WIN55,212-2 es un cannabinoide más potente y más eficaz que la AEA (Luk y cols., 2004; Ryberg y cols., 2007). Este hecho unido a que la AEA ejerce efectos directos muy marcados sobre el canal $hKv1.5$, nos llevó a elegir el compuesto sintético como herramienta para analizar los efectos mediados a través del receptor CB_1 sobre el canal.

Además de estudiar los efectos de la activación del receptor CB_1 por el WIN55,212-2 sobre la corriente $I_{hKv1.5}$ también estudiamos, como control negativo, los posibles efectos directos de este compuesto sobre el canal. Sorprendentemente, al comparar los efectos del WIN55,212-2 sobre la $I_{hKv1.5}$ en células que no expresaban endógenamente ningún receptor CB con los efectos que producía el WIN55,212-2 sobre la corriente registrada en células CHO- CB_1 , observamos que a todas las concentraciones estudiadas los efectos eran prácticamente idénticos. Por lo tanto, la activación del receptor CB_1 en líneas celulares de mamífero no interviene en el bloqueo observado sino que esa inhibición se debe exclusivamente a un bloqueo directo del WIN55,212-2 sobre los canales cardiacos $hKv1.5$. Los mismos resultados se obtuvieron al estudiar la corriente nativa I_{Kur} en miocitos auriculares disociados enzimáticamente, en los que la activación del receptor CB_1 por el WIN55,212-2 no intervenía en la inhibición observada de dicha corriente. Estos resultados coinciden con los del grupo de Van den Bossche y Vanheel que tampoco observaron efectos mediados a través de receptor con el WIN55,212-2 sobre la corriente rectificadora tardía de células musculares lisas de aorta de rata (Van den Bossche y Vanheel, 2000). Sin embargo, nuestros resultados contrastan con estudios previos donde se había demostrado que la activación del receptor CB_1 por el WIN55,212-2 inhibía corrientes de Ca^{2+} tipo N y P/Q (Caulfield y Brown, 1992; Mackie y Hille, 1992; Mackie y cols, 1995; Pan y cols., 1996; Twitchell y cols., 1997) y otras corrientes de K^+ neuronales como la tipo D (I_D) o la tipo M (I_M) (Deadwyler y cols., 1993; Deadwyler y cols., 1995; Pan y cols., 1996; Mu y cols., 1999) o con otros estudios que demostraron que el WIN55,212-2 ejercía tanto efectos directos como mediados a través de receptor sobre canales neuronales de Na^+ o de Ca^{2+} tipo N (Shen y Thayer, 1998; Guo e Ikeda, 2004; Németh y cols., 2008).

3.2. Efectos del LPI y de la PEA mediados a través del receptor GPR55 sobre la $I_{hKv1.5}$ y la I_{Kur}

Se ha sugerido que en el aparato cardiovascular debe existir al menos otro receptor para cannabinoides diferente de CB_1 y de CB_2 . El receptor que surgió como principal candidato fue el GPR55 (Baker y cols., 2006; Lauckner y cols., 2008; Waldeck-Weiermair y cols., 2008). Su ligando endógeno natural es el LPI aunque se ha descrito que también puede ser activado por otros compuestos como la AEA o la PEA (Sawzdargo y cols, 1999; Baker y cols., 2006; Oka y cols., 2007; Pertwee, 2007; Ryberg y cols., 2007).

Como hemos visto anteriormente, el LPI y la PEA no son compuestos muy potentes para bloquear de forma directa los canales $hKv1.5$, por lo que eran una herramienta óptima para poder estudiar los posibles efectos debidos a la estimulación del receptor GPR55.

El hecho de que en presencia del receptor GPR55, el LPI y la PEA sean mucho más potentes para bloquear los canales $hKv1.5$ y de que además sean capaces de desplazar significativamente la curva de activación hacia potenciales más negativos, efecto que no se observaba en las células sin receptor, sugiere que la $I_{hKv1.5}$ registrada en líneas celulares de mamífero puede ser modulada por el receptor GPR55 cuando éste es estimulado por agonistas endógenos como el LPI o la PEA a concentraciones en el rango micromolar bajo. Resultados similares se han descrito en células HEK-293 que expresaban el receptor GPR55 y el canal $Kv7.2/Kv7.3$ que genera la I_M neuronal. La estimulación del receptor por diferentes agonistas producía una mayor inhibición de la corriente que la que éstos producían en células que no expresaban el receptor GPR55 (Lauckner y cols., 2008).

Sin embargo, nuestros resultados no se reprodujeron al estudiar los efectos del LPI y la PEA sobre la corriente nativa I_{Kur} registrada en miocitos auriculares procedentes de pacientes en RS. Es más, en miocitos auriculares obtenidos de pacientes con FAC, donde habíamos descrito un aumento en la expresión del ARNm de los receptores GPR55, tampoco observamos que la activación de dichos receptores por sus ligandos endógenos modulara la I_{Kur} . Estos resultados podrían deberse a que el aumento observado en los niveles de ARNm no se tradujera en un aumento en la expresión de la proteína en la membrana de los miocitos o bien a que algún intermediario de la ruta de señalización implicada estuviera limitado.

4. IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LOS RESULTADOS

Más allá de sus bien estudiadas acciones neurocomportamentales e inmunológicas, los endocannabinoides y los análogos de endocannabinoides ejercen importantes efectos cardiovasculares (Pacher y cols., 2005b). Las acciones cardiovasculares de los endocannabinoides son complejas y muy variadas. Se han descrito efectos sobre la vasculatura, el miocardio y el sistema nervioso autónomo (Pacher y cols., 2005b y 2006; Li y cols., 2009).

Los efectos mediados a través de la interacción de los endocannabinoides con sus receptores sobre el aparato cardiovascular (descenso de la presión arterial, contractilidad y frecuencia cardíacas) han sido descritos extensamente (Pacher y cols., 2006). Por otra parte, los receptores CB₂ han sido implicados en el preconditionamiento isquémico y en el daño por isquemia/reperfusión en el miocardio (Pacher y cols., 2005b).

Además, se han descrito efectos directos de estos compuestos sobre la excitabilidad neuronal (Venance y cols., 1995), la modulación del dolor (Wiley y cols., 2006) y la función cardiovascular (Pacher y cols., 2005b, 2006). En este sentido, la AEA puede modular canales iónicos, activar receptores vanilloides y actuar sobre otras dianas (Pacher y cols., 2005b; Oz, 2006). Sin embargo, los efectos de los endocannabinoides sobre la actividad eléctrica cardíaca han sido escasamente estudiados.

4.1. El SCE en diferentes situaciones patológicas

Se ha descrito que en diversas situaciones patológicas se produce un aumento de la síntesis de endocannabinoides y/o de la expresión de sus receptores (Varga y cols., 1998; Wang y cols., 2001; Pertwee 2005b; Naccarato y cols., 2010; Miller y Devi, 2011). Los endocannabinoides y sus análogos pueden ser sintetizados en el corazón (Pacher y cols., 2005b, 2006) y por ello, diferentes autores han demostrado que en determinadas patologías del aparato cardiovascular, podría producirse ese aumento. En miocardio y aorta de ratas hipertensas se observó un aumento de la expresión del receptor CB₁ y en ellas la administración de AEA provocaba una disminución de la presión arterial, de la contractilidad y de las resistencias vasculares (Lake y cols., 1997; Bátakai y cols., 2004b). Asimismo, se ha descrito que los receptores CB₂ incrementan su expresión en placas ateroscleróticas tanto de rata como de humanos (Steffens y cols., 2005), que en diferentes cánceres humanos existe un aumento en la expresión de receptores CB (Sarfaraz y cols., 2008) y que en tejido adiposo de

ratas Zucker obesas hay un aumento en la expresión de los receptores CB₁ (Bensaid y cols., 2003). Recientemente se ha descrito que el receptor GPR55 está más expresado en tejido adiposo de pacientes obesos y con diabetes tipo 2 que en sujetos no obesos (Moreno-Navarrete y cols., 2012).

Por otra parte, se ha descrito que un aumento en los niveles de 2-AG produce una disminución de la placa de ateroma en arterias coronarias de ratones a través de la activación del receptor CB₂ (Steffens y cols., 2005) y que además, ese aumento, tiene efectos protectores frente a la isquemia miocárdica y la hipoxia en ratas (Joyeux y cols., 2002; Shmist y cols., 2006). Asimismo, se ha descrito un aumento de las concentraciones de AEA y 2-AG en pacientes con infarto agudo de miocardio o en condiciones de isquemia/reperfusión (Wang y cols., 2012) e incluso también en pacientes que han sufrido shock endotóxico (Wang y cols., 2001). Estos cambios en los niveles de endocannabinoides tendrían efectos cardioprotectores debido a su acción sobre los receptores CB (Wang y cols., 2012).

Otro ejemplo importante es la participación del SCE en la génesis de la obesidad y en la del SM (Ravinet y cols., 2003; Di Marzo y Petrosino, 2007; Mouslech y Valla, 2009). En España, 1 de cada 2 adultos tiene sobrepeso, el 16% son obesos (Devaux y Sassi, 2013) y un 31% de la población presenta SM (Fernández-Bergés y cols., 2012). La relación entre la obesidad y el riesgo de desarrollar diversas enfermedades cardiovasculares ha sido bien estudiada en múltiples estudios epidemiológicos (Stern, 1995; Rexrode y cols., 1996; Chaput y cols., 2005; Anand y cols., 2008; Mattioli, 2011). De hecho, se ha descrito que un aumento en las concentraciones plasmáticas de endocannabinoides (que están aumentados en pacientes obesos respecto a sus controles) (Pertwee, 2005; Matias y cols., 2006; Di Marzo y Petrosino, 2007; Côté y cols., 2007; Aronne e Isoldi, 2007), se correlacionaba con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares (Côté y cols., 2007; Hiley, 2009; Quercioli y cols., 2011), por lo que una de las nuevas estrategias que se propuso en el tratamiento de la obesidad fue la modulación del SCE. Además, la obesidad y el SM son un factor de riesgo asociado a patologías que aumentan la incidencia de FA (p.ej. HTA, cardiopatía isquémica, diabetes, insuficiencia cardíaca) así como a la propia FA (Wang y cols., 2004; Zacharias y cols., 2005; Fuster y cols., 2006; Dublin y cols., 2006; Nicolaou y cols., 2007; Wanahita y cols., 2008; Watanabe y cols., 2008b). En 2008 se llevó a cabo un meta-análisis de 16 estudios que incluían 123.249 pacientes y demostró que el sobrepeso y la obesidad aumentaban el riesgo de FA en un 39% y en un 87%, respectivamente (Wanahita y cols., 2008). Ello ha llevado a proponer que una reducción del peso corporal podría asociarse a una menor incidencia de FA (Wang y cols., 2004; Wanahita y cols., 2008).

4.2. Modulación del SCE en la FA

Los endocannabinoides y sus análogos pueden ser sintetizados en el corazón (Pacher y cols., 2005 y 2006). Éstos no se almacenan sino que son producidos “a demanda”, siendo su síntesis estimulada en situaciones de daño tisular (Pacher y cols., 2006). Parece razonable asumir que, de forma análoga, la síntesis miocárdica de estos compuestos aumentase durante las taquiarritmias auriculares como la FA, en la que se produce inflamación, estrés oxidativo, fibrosis y apoptosis (Kourliouros y cols., 2009). Además, se ha demostrado que la síntesis de endocannabinoides aumenta en tejido nervioso al estimularlo a altas frecuencias y al aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ (Pacher y cols., 2006), condiciones que también están asociadas a la FA (Kourliouros y cols., 2009) y que podrían por tanto relacionarse con un aumento en la síntesis de endocannabinoides en esta patología.

La FA es la arritmia con mayor prevalencia en la población general. Datos recientes señalan que un 4.4% de la población española mayor de 40 años sufre esta patología alcanzando más de un 17% en los mayores de 80 años (Gómez-Doblas y cols., 2013). También es la arritmia que más hospitalizaciones y gastos sanitarios origina (Fuster y cols., 2006). Además de la sintomatología propia de la arritmia, la FA aumenta la incidencia de insuficiencia cardíaca y de tromboembolismos e ictus (5.3% vs 0.8% en pacientes tratados con antiagregantes y anticoagulantes) y duplica la mortalidad (Fuster y cols., 2006, Hart y Halperin, 2001). La FA, *per se*, altera/remodela las propiedades electrofisiológicas del tejido auricular, produciendo un acortamiento no uniforme de la DPA y del periodo refractario auricular que es secundario a cambios en la expresión de los canales que participan en la repolarización auricular (Tamargo y cols., 2004a; Fuster y cols., 2006; Nattel y cols., 2007). Este remodelado eléctrico promueve el mantenimiento y recurrencia de la arritmia y es responsable de la pérdida de efectividad de los fármacos antiarrítmicos clásicos cuando la arritmia persiste más de 72 horas.

En esta Tesis Doctoral se ha descrito por primera vez un aumento de la expresión de los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 en tejido cardíaco auricular de pacientes con FAC con respecto a aquellos que permanecían en RS. De igual forma, se ha descrito, que la FA produce cambios en la expresión de diferentes receptores presentes en el miocardio, como el receptor de angiotensina II tipo 1 (Boldt y cols., 2003), los receptores muscarínicos (Yeh y cols., 2007) o más recientemente, los receptores β -adrenérgicos (González de la Fuente y cols., 2013), por lo que es posible que el aumento de la expresión de los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 pudiera formar parte del complejo remodelado que induce la FA. Por tanto, los datos sugieren

una implicación directa del SCE en la FA, por lo que la modulación de este sistema podría representar una nueva estrategia en el abordaje de la FA, particularmente, en pacientes obesos o con sobrepeso.

4.3. Implicaciones de la inhibición de la I_{Kur} en pacientes con FA

En el presente estudio, se demuestra por primera vez, que los endocannabinoides a concentraciones dentro del rango micromolar ($\approx 0.9 \mu\text{M}$), bloquean de forma directa los canales cardiacos humanos hKv1.5 así como la corriente nativa I_{Kur} . Los estudios de desplazamiento de radioligandos indican que los valores de K_i de la AEA y del 2-AG están comprendidos entre 31-543 nM y 58-519 nM, respectivamente para los receptores CB_1 (Ryberg y cols., 2007; Kapur y cols., 2009). Sin embargo, es extremadamente difícil establecer un rango de concentraciones fisiológicas para los endocannabinoides, ya que son sustancias muy lipofílicas que se sintetizan y acumulan en las membranas celulares.

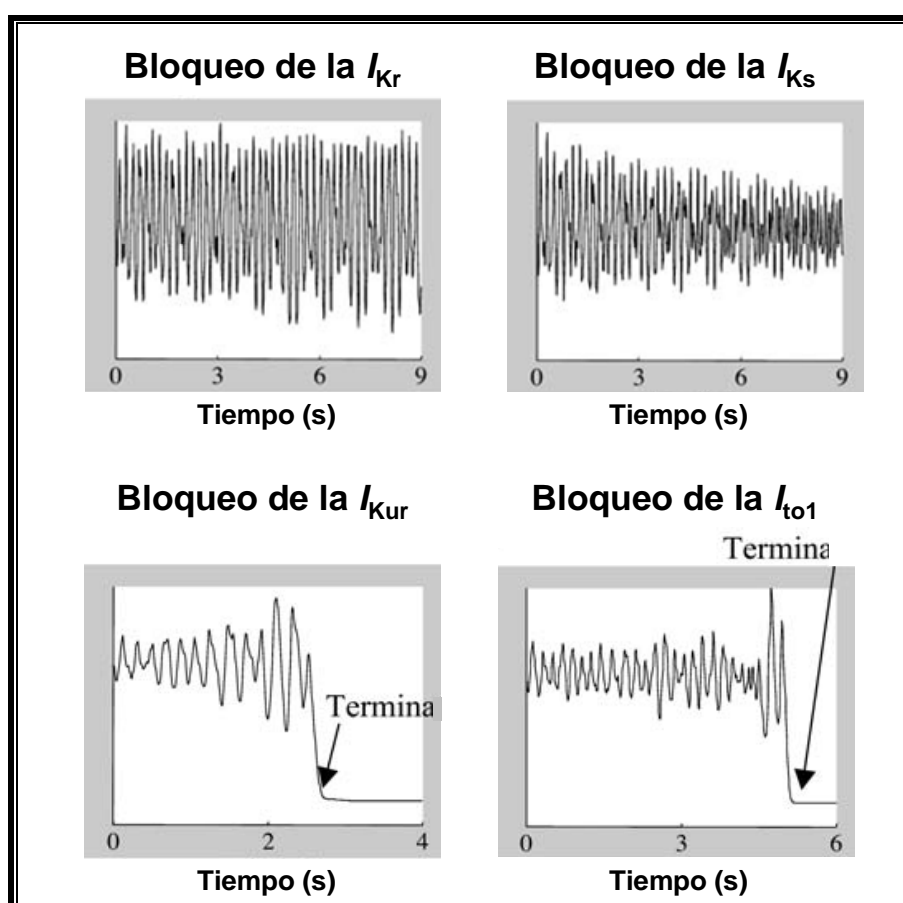


Figura V.2. Efecto sobre los rotadores del bloqueo de corrientes de K^+ . Actividad de los rotadores registrada en un pseudo-ECG cuando se bloquean individualmente las principales corrientes de salida de K^+ : I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Kur} e I_{to1} . [Adaptada de Pandit y cols., 2005]

Hasta hace poco tiempo, se creía que prolongar la duración de la parte final del PA bloqueando las corrientes I_{Kr} e I_{Ks} era la mejor estrategia terapéutica en el tratamiento de la FA. De esta forma, el periodo refractario se prolongaría y, con ello, cesaría la reentrada del impulso en el miocardio porque el frente de onda que estaba avanzando sobre la cola de refractariedad se encontraría ahora con tejido inexcitable (Allessie y cols., 1973).

Tanto los datos clínicos como los experimentales, han demostrado que esta estrategia basada en la prolongación de la longitud de onda ($LO = \text{velocidad de conducción} \times \text{periodo refractario}$) es totalmente ineficiente en la FA (Cosío y Delpón, 2002). Los estudios de mapeo óptico con colorantes potenciométricos, han llevado a la demostración de que los frentes que invaden el miocardio son curvos, de tal forma que giran en torno a un punto estacionario (pivote) de forma similar a un vórtice o rotor.

Los modelos matemáticos sobre la dinámica de estas fuentes de reentrada sostenida de alta frecuencia o rotores, propuestos por los Dres. Jalife y Nattel (Pandit y cols., 2005) han demostrado que es el bloqueo de las corrientes que determinan la fase de meseta del PA auricular, la I_{to1} y la I_{Kur} , lo que hace que el rotor que genera la arritmia se extinga (Figura V.2) con mínimos efectos sobre la repolarización ventricular (Blaauw y cols., 2004; Burashnikov y cols., 2004; Wettwer y cols., 2004). La potente inhibición de la $I_{hKv1.5}$ y de la I_{Kur} producida por los endocannabinoides y los efectos que éstos producen sobre la DPA auricular (al 20%, 50% y 90% de la repolarización), podrían estar apuntando a un posible efecto beneficioso de los endocannabinoides en la FA. Por lo tanto, serían necesarios más estudios acerca de los efectos del SCE sobre otras corrientes iónicas para tratar de entender la implicación de dicho sistema en la electrofisiología cardíaca.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones

En la presente Tesis Doctoral hemos analizado los efectos de los endocannabinoides y sus análogos sobre los canales hKv1.5 expresados en células *Ltk* y en células CHO que expresaban los receptores CB₁ y GPR55, y sobre la corriente nativa I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos. Además hemos analizado la expresión de los receptores CB en tejido auricular de pacientes con FAC y en RS. De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los endocannabinoides AEA y 2-AG, así como el análogo no hidrolizable de la AEA, la MetAEA, inhiben la corriente generada por los canales hKv1.5. Esta inhibición es independiente de su interacción con los receptores CB. Sin embargo, los endocannabinoides PEA y LPI son menos potentes para inhibir la $I_{hKv1.5}$. Los ácidos grasos también bloquean los canales hKv1.5 en función de la complejidad de su estructura, siendo el orden de potencia: ácido palmítico < ácido esteárico < ácido araquidónico < ácido oleico.
2. El bloqueo que produce la AEA y el 2-AG sobre el canal hKv1.5 es consecuencia de la interacción directa de los endocannabinoides con la cara extracelular del canal, siendo el residuo R487 crítico para dicha interacción.
3. El endocanabinoide AEA inhibe, de manera directa e independiente de receptores, la corriente nativa I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos.
4. La AEA prolonga la duración del PA auricular registrado en preparaciones auriculares de ratón, siendo este efecto independiente de la presencia de receptores CB.
5. Los receptores CB₁, CB₂ y GPR55 se expresan en tejido cardíaco auricular. Dicha expresión se encuentra aumentada en las muestras procedentes de pacientes con FAC.
6. La estimulación de los receptores CB₁ y GPR55 conduce a la inhibición de la $I_{hKv1.5}$ registrada en células CHO; sin embargo no parecen modular la corriente nativa I_{Kur} registrada en miocitos auriculares humanos.

Por todo ello proponemos que los endocannabinoides podrían actuar como moduladores de los canales hKv1.5, responsables de la génesis de la corriente cardíaca humana I_{Kur} y, por tanto, modular la morfología del PA auricular. Este efecto podría ser de particular importancia

Conclusiones

en aquellas situaciones en las que la síntesis de endocannabinoides se vea aumentada como ocurre en el caso de la FA.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abadji V, Lin S, Taha G, Griffin G, Stevenson LA, Pertwee RG, Makriyannis A. (R)-methanandamide: a chiral novel anandamide possessing higher potency and metabolic stability. *J Med Chem* 1994;**37**:1889-1893.
- Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;**97**:175-187.
- Abriel H. Cardiac sodium channel $Na_v1.5$ and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:2-11.
- Accili EA, Kiehn J, Yang Q, Wang Z, Brown AM, Wible BA. Separable $K_v\beta$ subunit domains alter expression and gating of potassium channels. *J Biol Chem* 1997;**272**:25824-25831.
- Aimond F, Kwak SP, Rhodes KJ, Nerbonne JM. Accessory $K_v\beta 1$ subunits differentially modulate the functional expression of voltage-gated K^+ channels in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 2005;**96**:451-458.
- Aldhoon B, Melenovský V, Peichl P, Kautzner J. New insights into mechanisms of atrial fibrillation. *Physiol Res* 2010;**59**:1-12.
- Aldrich RW, Corey DP, Stevens CF. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording. *Nature* 1983;**306**:436-441.
- Aldrich RW. Fifty years of inactivation. *Nature* 2001;**411**:643-644.
- Aliot E, Capucci A, Crijns HJ, Goette A, Tamargo J. Twenty-five years in the making: flecainide is safe and effective for the management of atrial fibrillation. *Europace* 2011;**13**:161-173.
- Allessie MA, Bonke FI, Schopman FJ. Circus movement in rabbit atrial muscle as a mechanism of tachycardia. *Circ Res* 1973;**33**:54-62.
- Allessie MA, Lammers WJ, Bonke FI, Hollen J. Experimental evaluation of Moe's multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. *Cardiac Electrophysiology and Arrhythmias* 1985, pp. 265-276.
- Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kléber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001;**103**:769-777.
- Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:230-246.
- Amin AS, Asghari-Roodsari A, Tan HL. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch* 2010;**460**:223-237.
- Amorós I, Barana A, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP, Tamargo J, Delpón E. Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac $K_v4.3$ channels in a receptor-independent manner. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:201-210.
- Amorós I, Jiménez-Jáimez J, Tercedor L, Barana A, Gómez R, de la Fuente MG, Dolz-Gaitón P, Alvarez M, Martínez-Espín E, Lorente JA, Melgares R, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2011;**8**:463-470.
- Amorós I, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Matamoros M, Barana A, de la Fuente MG, Núñez M, Pérez-Hernández M, Moraleda I, Gálvez E, Iriepa I, Tamargo J, Caballero R, Delpón E. Propafenone blocks human cardiac $Kir2.x$ channels by decreasing the negative electrostatic charge in the cytoplasmic pore. *Biochem Pharmacol* 2013;**86**:267-278.
- Amos GJ, Wettwer E, Metzger F, Li Q, Himmel HM, Ravens U. Differences between outward currents of human atrial and subepicardial ventricular myocytes. *J Physiol* 1996;**491**:31-50.
- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*

- 2000;**403**:553-556.
- Anand RG, Peters RW, Donahue TP. Obesity and dysrhythmias. *J Cardiometab Syndr* 2008;**3**:149-154.
- Andersen OS, Bruno MJ, Sun H, Koeppe RE 2nd. Single-molecule methods for monitoring changes in bilayer elastic properties. *Methods Mol Biol* 2007;**400**:543-570.
- Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellke FW, Shen WK, Wann LS, Curtis AB, Ellenbogen KA, Estes NA 3rd, Ezekowitz MD, Jackman WM, January CT, Lowe JE, Page RL, Slotwimer DJ, Stevenson WG, Tracy CM, Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Le Heuzey JY, Kay GN, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S. Management of patients with atrial fibrillation (compilation of 2006 ACCF/AHA/ESC and 2011 ACCF/AHA/HRS recommendations): a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013;**61**:1935-1944.
- Antzelevitch C, Sicouri S, Litovsky SH, Lukas A, Krishnan SC, Di Diego JM, Gintant GA, Liu DW. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res* 1991;**69**:1427-1449.
- Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP Jr, Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu LF, Haïssaguerre M, Schimpf R, Borggrete M, Wolpert C. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* 2007;**115**:442-449.
- Anumonwo JM, Lopatin AN. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:45-54.
- Apkon M, Nerbonne JM. Alpha 1-adrenergic agonists selectively suppress voltage-dependent K⁺ current in rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;**85**:8756-60.
- Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *J Gen Physiol* 1991;**97**:973-1011.
- Armstrong CM, Bezanilla F. Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels. *Nature* 1973; **242**:459-461.
- Armstrong CM. Ionic pores, gates, and gating currents. *Q Rev Biophys* 1974;**7**:179-210.
- Armstrong CM. Sodium channel and gating currents. *Physiol Rev* 1981;**61**:644-682.
- Aronne LJ, Isoldi KK. Overweight and obesity: key components of cardiometabolic risk. *Clin Cornerstone* 2007;**8**:29-37.
- Ashton JC, Smith PF. Cannabinoids and cardiovascular disease: the outlook for clinical treatments. *Curr Vasc Pharmacol* 2007;**5**:175-185.
- Ausma J, Wjffels M, Thoné F, Wouters L, Allesie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997;**96**:3157-3163.
- Aviles RJ, Martin DO, Apperson-Hansen C, Houghtaling PL, Rautaharju P, Kronmal RA, Tracy RP, Van Wagoner DR, Psaty BM, Lauer MS, Chung MK. Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. *Circulation* 2003;**108**:3006-3010.
- Bachmann A, Gutcher I, Kopp K, Brendel J, Bosch RF, Busch AE, Gögelein H. Characterization of a novel Kv1.5 channel blocker in Xenopus oocytes, CHO cells, human and rat cardiomyocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;**364**:472-478.
- Bachur NR, Masek K, Melmon KL, Udenfriend S. Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues. *J Biol Chem* 1965;**240**:1019-1024.
- Bähring R, Milligan CJ, Vardanyan V, Engeland B, Young BA, Dannenberg J, Waldschutz R,

- Edwards JP, Wray D, Pongs O. Coupling of voltage-dependent potassium channel inactivation and oxidoreductase active site of Kvbeta subunits. *J Biol Chem* 2001;**276**:22923-9.
- Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ. The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol* 2003;**2**:291-298.
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR. In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 2006;**27**:1-4.
- Balser JR, Nuss HB, Romashko DN, Marban E, Tomaselli GF. Functional consequences of lidocaine binding to slow-inactivated sodium channels. *J Gen Physiol* 1996;**107**:643-658.
- Balser JR. The cardiac sodium channel: gating function and molecular pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:599-613.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. K_vLQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I_{Ks} cardiac potassium current. *Nature* 1996;**384**:78-80.
- Baruscotti M, Barbuti A, Bucchi A. The cardiac pacemaker current. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:55-64.
- Bátkai S, Járαι Z, Wagner JA, Goparaju SK, Varga K, Liu J, Wang L, Mirshahi F, Khanolkar AD, Makriyannis A, Urbaschek R, Garcia N Jr, Sanyal AJ, Kunos G. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. *Nat Med* 2001;**7**:827-832.
- Bátkai S, Pacher P, Járαι Z, Wagner JA, Kunos G. Cannabinoid antagonist SR-141716 inhibits endotoxic hypotension by a cardiac mechanism not involving CB1 or CB2 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004a;**287**:H595-600.
- Bátkai S, Pacher P, Osei-Hyiaman D, Radaeva S, Liu J, Harvey-White J, Offertaler L, Mackie K, Rudd MA, Bukoski RD, Kunos G. Endocannabinoids acting at cannabinoid-1 receptors regulate cardiovascular function in hypertension. *Circulation* 2004b;**110**:1996-2002.
- Bátkai S, Pacher P. Endocannabinoids and cardiac contractile function: pathophysiological implications. *Pharmacol Res* 2009;**60**:99-106.
- Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Barg J, Mechoulam R, Vogel Z. The peripheral cannabinoid receptor: adenylate cyclase inhibition and G protein coupling. *FEBS Lett* 1995;**375**:143-147.
- Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 1989;**51**:367-384.
- Beatch GN, Lin SP, Hesketh C, Johnson B.D, Ezrin A.M, Fedida D. Electrophysiological mechanism of RSD1235, a new atrial fibrillation converting drug. *Circulation* 2003;**108**:IV-85.
- Beeler GW, Reuter H. Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibers. *J Physiol* 1977;**268**:177-210.
- Begg M, Mo FM, Offertaler L, Bátкаи S, Pacher P, Razdan RK, Lovinger DM, Kunos G. G protein-coupled endothelial receptor for atypical cannabinoid ligands modulates a Ca²⁺-dependent K⁺ current. *J Biol Chem* 2003;**278**:46188-46194.
- Begg M, Pacher P, Bátкаи S, Osei-Hyiaman D, Offertaler L, Mo FM, Liu J, Kunos G. Evidence for novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 2005;**106**:133-145.
- Bellocchio L, Cervino C, Pasquali R, Pagotto U. The endocannabinoid system and energy metabolism. *J Neuroendocrinol* 2008;**20**:850-857.
- Bellocq C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM, Baro I, Wilde AA. Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* 2004;**109**:2394-2397.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 1997;**277**:1094-1097.
- Beltramo M, Piomelli D. Carrier-mediated transport

- p>and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol.
- Neuroreport*
- 2000;
- 11**
- :1231-1235.
- Ben Amar M. Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol* 2006;**105**:1-25.
- Bendahhou S, Marionneau C, Haurogne K, Larroque MM, Derand R, Szuts V, Escande D, Demolombe S, Barhanin J. In vitro molecular interactions and distribution of KCNE family with KCNQ1 in the human heart. *Cardiovasc Res* 2005;**67**:529-538.
- Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998;**98**:946-952.
- Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubri   P. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrcp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003;**63**:908-914.
- Berenfeld O, Zaitsev AV, Mironov SF, Pertsov AM, Jalife J. Frequency-dependent breakdown of wave propagation into fibrillatory conduction across the pectinate muscle network in the isolated sheep right atrium. *Circ Res* 2002;**90**:1173-1180.
- Berger M, Schweitzer P. Timing of thromboembolic events after electrical cardioversion of atrial fibrillation or flutter: a retrospective analysis. *Am J Cardiol* 1998;**82**:1545-1547.
- Bers DM, Pérez-Reyes E. Ca²⁺ channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:339-360.
- Bertaso F, Sharpe CC, Hendry BM, James AF. Expression of voltage-gated K⁺ channels in human atrium. *Basic Res Cardiol* 2002;**97**:424-433.
- Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:379-385.
- Bezanilla F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiol Rev* 2000;**80**:555-592.
- Bezanilla F. Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 2002;**120**:465-73.
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 2000;**25**:177-90.
- Bidaud I, Lory P. Hallmarks of the channelopathies associated with L-type calcium channels: A focus on the Timothy mutations in Ca_v1.2 channels. *Biochimie* 2011;**93**:2080-2086.
- Bisogno T, MacCarrone M, De Petrocellis L, Jarrahan A, Finazzi-Agr   A, Hillard C, Di Marzo V. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem* 2001;**268**:1982-1989.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 2003;**163**:463-468.
- Bjerregaard P, Gussak I. Short QT syndrome: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;**2**:84-87.
- Blaauw Y, Gögelein H, Tieleman RG, van Hunnik A, Schotten U, Allessie MA. "Early" class III drugs for the treatment of atrial fibrillation: efficacy and atrial selectivity of AVE0118 in remodeled atria of the goat. *Circulation* 2004;**110**:1717-1724.
- Blázquez C, Salazar M, Carracedo A, Lorente M, Egia A, González-Feria L, Haro A, Velasco G, Guzmán M. Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Res* 2008;**68**:1945-1952.

- Bodi I, Mikala G, Koch SE, Akhter SA, Schwartz A. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J Clin Invest* 2005;**115**:3306-17.
- Boldt A, Wetzel U, Weigl J, Garbade J, Lauschke J, Hindricks G, Kottkamp H, Gummert JF, Dhein S. Expression of angiotensin II receptors in human left and right atrial tissue in atrial fibrillation with and without underlying mitral valve disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;**42**:1785-1792.
- Bondarenko A, Waldeck-Weiermair M, Naghdi S, Poteser M, Malli R, Graier WF. GPR55-dependent and -independent ion signalling in response to lysophosphatidylinositol in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2010;**161**:308-320.
- Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR. Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;**287**:884-888.
- Bonz A, Laser M, Küllmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, Ertl G, Wagner JA. Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;**41**:657-664.
- Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C, Kuhlkamp V. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999;**44**:121-131.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrié B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P. Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 1995;**312**:637-641.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrié B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P. Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem* 1996;**237**:704-711.
- Bouaboula M, Bianchini L, McKenzie FR, Pouyssegur J, Casellas P. Cannabinoid receptor CB1 activates the Na⁺/H⁺ exchanger NHE-1 isoform via Gi-mediated mitogen activated protein kinase signaling transduction pathways. *FEBS Lett* 1999;**449**:61-65.
- Bouchard JF, Lépicier P, Lamontagne D. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci* 2003;**72**:1859-1870.
- Boutjdir M, Le Heuzey JY, Lavergne T, Chauvaud S, Guize L, Carpentier A, Peronneau P. Inhomogeneity of cellular refractoriness in human atrium: factor of arrhythmia? *Pacing Clin Electrophysiol* 1986;**9**:1095-1100.
- Bowditch H. Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskel fägen des Herzens ziegen. *Arb Physiol Anstalt* 1871;**6**:139-176.
- Boyett MR. A study of the effect of the rate of stimulation on the transient outward current in the sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol* 1981;**319**:1-22.
- Brehm P, Eckert R. Calcium entry leads to inactivation of calcium channel in Paramecium. *Science* 1978;**202**:1203-1206.
- Breitwieser GE, Szabo G. Mechanism of muscarinic receptor-induced K⁺ channel activation as revealed by hydrolysis-resistant GTP analogues. *J Gen Physiol* 1988;**91**:469-493.
- Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 2001;**60**:155-163.
- Brendel J, Peukert S. Blockers of the Kv1.5 channels for treatment of atrial arrhythmias. *Exp Opin Ther Pat* 2002;**12**:1589-1598.
- Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007;**152**:567-575.
- Brown AM, Lee KS, Powell T. Sodium current in single rat heart muscle cells. *J Physiol* 1981;**318**:479-500.
- Brown SM, Wager-Miller J, Mackie K. Cloning and molecular characterization of the rat

- CB2 cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 2002;**1576**:255-264.
- Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerchicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. Sudden death associated with short QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* 2004;**109**:30-35.
- Bruins P, te Velthuis H, Yazdanbakhsh AP, Jansen PG, van Hardevelt FW, de Beaumont EM, Wildevuur CR, Eijnsman L, Trouwborst A, Hack CE. Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia. *Circulation* 1997;**96**:3542-3548.
- Brundel BJ, van Gelder IC, Henning RH, Tuinenburg AE, Deelman LE, Tieleman RG, Grandjean JG, van Gilst WH, Crijns HJ. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:443-454.
- Brundel BJ, Van Gelder IC, Henning RH, Tieleman RG, Tuinenburg AE, Wietses M, Grandjean JG, Van Gilst WH, Crijns HJ. Ion channel remodeling is related to intraoperative atrial effective refractory periods in patients with paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Circulation* 2001;**103**:684-690.
- Brundel BJ, Ausma J, van Gelder IC, Van der Want JJ, van Gilst WH, Crijns HJ, Henning RH. Activation of proteolysis by calpains and structural changes in human paroxysmal and persistent atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:380-389.
- Bruno MJ, Koeppe RE 2nd, Andersen OS. Docosahexaenoic acid alters bilayer elastic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:9638-9643.
- Buraei Z, Yang J. The β subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Physiol Rev* 2010;**90**:1461-1506.
- Burashnikov A, Mannava S, Antzelevitch C. Transmembrane action potential heterogeneity in the canine isolated arterially perfused right atrium: effect of I_{Kr} and $I_{\text{Kur}}/I_{\text{to}}$ block. *Am J Physiol* 2004;**286**:H2393-H2400.
- Burashnikov E, Pfeiffer R, Barajas-Martinez H, Delpón E, Hu D, Desai M, Borggrefe M, Hässaguerre M, Kanter R, Pollevick GD, Guerchicoff A, Laiño R, Marieb M, Nademanee K, Nam GB, Robles R, Schimpf R, Stapleton DD, Viskin S, Winters S, Wolpert C, Zimmern S, Veltmann C, Antzelevitch C. Mutations in the cardiac L-type calcium channel associated with inherited J-wave syndromes and sudden cardiac death. *Heart Rhythm* 2010;**7**:1872-1882.
- Busch AE, Busch GL, Ford E, Suessbrich H, Lang HJ, Greger R, Kunzelmann K, Attali B, Stuhmer W. The role of Isk protein in the specific pharmacological properties of the I_{Ks} channel complex. *Br J Pharmacol* 1997;**122**:187-189.
- Caballero R, Delpón E, Valenzuela C, Longobardo M, Tamargo J. Losartan and its metabolite E3174 modify cardiac delayed rectifier $\text{K}(+)$ currents. *Circulation* 2000;**101**:1199-1205.
- Caballero R, Moreno I, González T, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Putative binding sites for benzocaine on a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 2002;**56**:104-117.
- Caballero R, Moreno I, González T, Arias C, Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-go-go-related gene channels. *Circulation* 2003;**107**:889-895.
- Caballero R, Gómez R, Moreno I, Núñez L, González T, Arias C, Guizy M, Valenzuela C, Tamargo J, Delpón E. Interaction of angiotensin II with the angiotensin type 2 receptor inhibits the cardiac transient outward potassium current. *Cardiovasc Res* 2004a;**62**:86-95.
- Caballero R, Gómez R, Núñez L, Moreno I, Tamargo J, Delpón E. Diltiazem inhibits hKv1.5 and Kv4.3 currents at therapeutic concentrations. *Cardiovasc Res* 2004b;**64**:457-66.

- Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, Barana A, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each atria and increases the slow component of the delayed rectifier current in both. *J Am Coll Cardiol* 2010a;**55**:2346-2354.
- Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, Barana A, González de la Fuente M, Osuna L, Duarte J, López-Izquierdo A, Moraleda I, Gálvez E, Sánchez-Chapula JA, Tamargo J, Delpón E. Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311, decreasing the polyamine-induced rectification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010b;**107**:15631-6.
- Calandra B, Portier M, Kernéis A, Delpech M, Carillon C, Le Fur G, Ferrara P, Shire D. Dual intracellular signaling pathways mediated by the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol* 1999;**374**:445-455.
- Calignano A, La Rana G, Beltramo M, Makriyannis A, Piomelli D. Potentiation of anandamide hypotension by the transport inhibitor, AM404. *Eur J Pharmacol* 1997;**337**:R1-2.
- Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 1998;**394**:277-281.
- Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, Van Gelder IC, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, Atar D, Colonna P, De Caterina R, De Sutter J, Goette A, Gorenek B, Heldal M, Hohloser SH, Kolh P, Le Heuzey JY, Ponikowski P, Rutten FH; European Heart Rhythm Association; European Association for Cardio-Thoracic Surgery; ESC Committee for Practice Guidelines. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Europace* 2010;**12**:1360-1420.
- Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohloser SH, Hindricks G, Kirchhof P; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 2012;**33**:2719-2747.
- Cannon SC, Brown RH Jr, Corey DP. A sodium channel defect in hyperkalemic periodic paralysis: potassium-induced failure of inactivation. *Neuron* 1991;**6**:619-26.
- Carmeliet E, Vereecke J. Electrogenesis of the action potential. En: *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System*. Berne R, Speralakis N, Geiger S. *American Physiological Society* 1979:269-334.
- Carmeliet E. Slow inactivation of the sodium current in rabbit cardiac Purkinje fibres. *Pflugers Arch* 1987;**408**:18-26.
- Carmeliet E. Mechanisms and control of repolarization. *Eur Heart J* 1993;**14**:3-13.
- Carmeliet E, Mubagwa K. Antiarrhythmic drugs and cardiac ion channels: mechanisms of action. *Prog Biophys Mol Biol* 1998;**70**:1-72.
- Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylethanolamide, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 2004;**65**:999-1007.
- Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;**26**:13-25.
- Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 2005a;**57**:397-409.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-

- p function relationships of voltage-gated calcium channels.
- Pharmacol Rev*
- 2005b;
- 57**
- :411-425.
- Caulfield MP, Brown DA. Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol* 1992;**106**:231-232.
- Cens T, Mangoni ME, Richard S, Nargeot J, Charnet P. Coexpression of the beta2 subunit does not induce voltage-dependent facilitation of the class C L-type Ca^{2+} channel. *Pflugers Arch* 1996;**431**:771-774.
- Centonze D, Battistini L, Maccarrone M. The endocannabinoid system in peripheral lymphocytes as a mirror of neuroinflammatory diseases. *Curr Pharm De.* 2008;**14**:2370-2442.
- Cha TJ, Ehrlich JR, Chartier D, Qi XY, Xiao L, Nattel S. Kir3-based inward rectifier potassium current: potential role in atrial tachycardia remodeling effects on atrial repolarization and arrhythmias. *Circulation* 2006;**113**:1730-1737.
- Chaput JP, Bérubé-Parent S, Tremblay A. Obesity and cardiovascular physiology: impact of some pharmacological agents. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;**3**:185-193.
- Chemin J, Monteil A, Perez-Reyes E, Nargeot J, Lory P. Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J* 2001;**20**:7033-7040.
- Chemin J, Nargeot J, Lory P. Chemical determinants involved in anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels. *J Biol Chem* 2007;**282**:2314-2323.
- Chen C y Cannon SC. Modulation of Na^{+} channel inactivation by the $\alpha 1$ subunit: a deletion analysis. *Pflügers Arch.* 1995;**431**:186-195.
- Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya A, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin JA, Wang Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* 1998;**392**:293-296.
- Chen SA, Hsieh MH, Tai CT, Tsai CF, Prakash VS, Yu WC, Hsu TL, Ding YA, Chang MS. Initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating from the pulmonary veins: electrophysiological characteristics, pharmacological responses, and effects of radiofrequency ablation. *Circulation* 1999;**100**:1879-1886.
- Chen YJ, Chen SA, Chang MS, Lin CI. Arrhythmogenic activity of cardiac muscle in pulmonary veins of the dog: implication for the genesis of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2000;**48**:265-273.
- Chen YJ, Chen SA, Chen YC, Yeh HI, Chan P, Chang MS, Lin CI. Effects of rapid atrial pacing on the arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins: implication in initiation of atrial fibrillation. *Circulation* 2001;**104**:2849-2854.
- Chen H, Kim LA, Rajan S, Xu S, Goldstein SA. Charybdotoxin binding in the I_{Ks} pore demonstrates two minK subunits in each channel complex. *Neuron* 2003a;**40**:15-23.
- Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003b;**299**:251-254.
- Chen L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackerman MJ, Kass RS. Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007a;**104**:20990-20995.
- Cheng WW, D'Avanzo N, Doyle DA, Nichols CG. Dual-Mode Phospholipid Regulation of Human Inward Rectifying Potassium Channels *Biophys J* 2011;**100**:620-628.
- Cheung DW. Pulmonary vein as an ectopic focus in digitalis-induced arrhythmia. *Nature* 1981;**294**:582-584.
- Chinchilla A, Daimi H, Lozano-Velasco E, Dominguez JN, Caballero R, Delpón E, Tamargo J, Cinca J, Hove-Madsen L, Aranega AE, Franco D. PITX2 insufficiency leads to atrial electrical and

- p>structural remodeling linked to arrhythmogenesis.
- Circ Cardiovasc Genet*
- 2011;
- 4**
- :269-279.
- Choe S. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 2002;**3**:115-121.
- Choi KL, Aldrich RW, Yellen G. Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;**88**:5092-5095.
- Choi KL, Mossman C, Aubé J, Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron* 1993;**10**:533-541.
- Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *EMBO J* 1997;**16**:5472-5479.
- Christie MJ, North RA, Osborne PB, Douglass J, Adelman JP. Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron* 1990;**4**:405-411.
- Chu ZL, Jones RM, He H, Carroll C, Gutierrez V, Lucman A, Moloney M, Gao H, Mondala H, Bagnol D, Unett D, Liang Y, Demarest K, Semple G, Behan DP, Leonard J. A role for beta-cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release. *Endocrinology* 2007;**148**:2601-2609.
- Chugh SS, Blackshear JL, Shen WK, Hammill SC, Gersh BJ. Epidemiology and natural history of atrial fibrillation: clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2001;**37**:371-378.
- Clarkson CW, Matsubara T, Hondeghem LM. Slow inactivation of V_{max} in guinea-pig ventricular myocardium. *Am J Physiol* 1984;**247**:H645-H654.
- Coetzee WA, Amarillo Y, Chiu J, Chow A, Lau D, McCormack T, Moreno H, Nadal MS, Ozaita A, Pountney D, Saganich M, Vega-Saenz de Miera E, Rudy B. Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* 1999;**868**:233-285.
- Conti LR, Radeke CM, Shyng SL, Vandenberg CA. Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* 2001;**276**:41270-41278.
- Coraboeuf E, Carmeliet E. Existence of two transient outward currents in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflugers Arch* 1982;**392**:352-359.
- Coraboeuf E, Otsuka M. L'action des solutions hyposodiques sur les potentiels cellulaires de tissu cardiaque de mammifères. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1956;**234**:441-444.
- Cordeiro JM, Marieb M, Pfeiffer R, Calloe K, Burashnikov E, Antzelevitch C. Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in CACNB2b underlies Brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2009;**46**:695-703.
- Cormier JW, Rivolta I, Tateyama M, Yang AS, Kass RS. Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* 2002;**277**:9233-41.
- Cosío FG, Delpón E. New antiarrhythmic drugs for atrial flutter and atrial fibrillation: a conceptual breakthrough at last? *Circulation* 2002;**105**:276-278.
- Cota D, Marsicano G, Tschöp M, Grübler Y, Flachskamm C, Schubert M, Auer D, Yassouridis A, Thöne-Reineke C, Ortmann S, Tomassoni F, Cervino C, Nisoli E, Linthorst AC, Pasquali R, Lutz B, Stalla GK, Pagotto U. The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* 2003;**112**:423-431.
- Cota D. The role of the endocannabinoid system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Neuroendocrinol* 2008;**20**:35-38.

- Côté M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Alméras N, Després JP, Di Marzo V. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. *Int J Obes* 2007;**31**:692-699.
- Courtemanche M, Ramirez RJ, Nattel S. Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation induced electrical remodeling: insights from a mathematical model. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:477-489.
- Covarrubias M, Wei AA, Salkoff L. Shaker, Shal, Shab, and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* 1991;**7**:763-773.
- Cox JL, Schuessler RB, Boineau JP. The surgical treatment of atrial fibrillation. I. Summary of the current concepts of the mechanisms of atrial flutter and atrial fibrillation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;**101**:402-405.
- Cranefield P, Aronson R. Cardiac Arrhythmias: The role of trigger activity and other mechanisms. Cranefield & Aronson. Futura 1975.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 1996;**384**:83-87.
- Crystal E, Garfinkle MS, Connolly SS, Ginger TT, Sleik K, Yusuf SS. Interventions for preventing post-operative atrial fibrillation in patients undergoing heart surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;**4**:CD003611.
- Cui J, Melman Y, Palma E, Fishman GI, McDonald TV. Cyclic AMP regulates the HERG K⁺ channel by dual pathways. *Curr Biol* 2000;**10**:671-674.
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* 1995;**80**:795-803.
- Dainese E, Oddi S, Bari M, Maccarrone M. Modulation of the endocannabinoid system by lipid rafts. *Curr Med Chem* 2007;**14**:2702-2715.
- Dalle Carbonare M, Del Giudice E, Stecca A, Colavito D, Fabris M, D'Arrigo A, Bernardini D, Dam M, Leon A. A saturated N-acylethanolamine other than N-palmitoyl ethanolamine with anti-inflammatory properties: a neglected story... *J Neuroendocrinol* 2008;Suppl 1:26-34.
- Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, George AL Jr, Roden DM. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation* 2008;**117**:1927-1935.
- Dascal N, Schreibmayer W, Lim NF, Wang W, Chavkin C, Dimagno L, Labarca C, Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C, Trollinger D, Lester HA, Davidson N. Atrial G protein-activated K⁺ channel: Expression cloning and molecular properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:10235-10239.
- De Bruin ML, Pettersson M, Meyboom RH, Hoes AW, Leufkens HG. Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. *Eur Heart J* 2005;**26**:590-597.
- De Petrocellis L, Orlando P, Di Marzo V. Anandamide, an endogenous cannabinomimetic substance, modulates rat brain protein kinase C in vitro. *Biochem Mol Biol Int* 1995;**36**:1127-1133.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V. Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundam Clin Pharmacol* 2002;**16**:297-302.
- De Petrocellis L, Marini P, Matias I, Moriello AS, Starowicz K, Cristino L, Nigam S, Di Marzo V. Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. *Exp Cell Res* 2007;**313**:2993-3004.
- De Petrocellis L, Di Marzo V. NonCB1 nonCB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol* 2010;**5**:103-121.

- De Vos CB, Pisters R, Nieuwlaet R, Prins MH, Tieleman RG, Coelen RJ, van den Heijckant AC, Allessie MA, Crijns HJ. Progression from paroxysmal to persistent atrial fibrillation clinical correlates and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2010;**55**:725-731.
- De Waard M, Pragnell M, Campbell KP. Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* 1994;**13**:495-503.
- Deadwyler SA, Hampson RE, Bennett BA, Edwards TA, Mu J, Pacheco MA, Ward SJ, Childers SR. Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Receptors Channels* 1993;**1**:121-134.
- Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S. Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;**273**:734-743.
- Decher N, Uyguner O, Scherer CR, Karaman B, Yüksel-Apak M, Busch AE, Steinmeyer K, Wollnik B. hKChIP2 is a functional modifier of hKv4.3 potassium channels: cloning and expression of a short hKChIP2 splice variant. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:255-264.
- Decher N, Barth AS, Gonzalez T, Steinmeyer K, Sanguinetti MC. Novel KChIP2 isoforms increase functional diversity of transient outward potassium currents. *J Physiol* 2004a;**557**:761-772.
- Decher N, Pirard B, Bundis F, Peukert S, Baringhaus KH, Busch AE, Steinmeyer K, Sanguinetti MC. Molecular basis for Kv1.5 channel block: conservation of drug binding sites among voltage-gated K⁺ channels. *J Biol Chem* 2004b;**279**:394-400.
- Decher N, Kumar P, Gonzalez T, Pirard B, Sanguinetti MC. Binding site of a novel Kv1.5 blocker: a "foot in the door" against atrial fibrillation. *Mol Pharmacol* 2006;**70**:1204-1211.
- Defer N, Wan J, Souktani R, Escoubet B, Perier M, Caramelle P, Manin S, Deveaux V, Bourin MC, Zimmer A, Lotersztajn S, Pecker F, Pavoine C. The cannabinoid receptor type 2 promotes cardiac myocyte and fibroblast survival and protects against ischemia/reperfusion-induced cardiomyopathy. *FASEB J* 2009;**23**:2120-2130.
- Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activating component of delayed rectifier K⁺ current in guinea pig ventricular myocytes. Voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res* 1995;**76**:223-235.
- Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Franqueza L, Gay P, Snyders DJ, Tamargo J. Mechanisms of block of a human cloned potassium channel by the enantiomers of a new bradycardic agent: S-16257-2 and S-16260-2. *Br J Pharmacol* 1996;**117**:1293-1301.
- Delpón E, Caballero R, Valenzuela C, Longobardo M, Snyders D, Tamargo J. Benzocaine enhances and inhibits the K⁺ current through a human cardiac cloned channel (Kv1.5). *Cardiovasc Res* 1999;**42**:510-520.
- Delpón E, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J. Angiotensin II, angiotensin II antagonists and spironolactone and their modulation of cardiac repolarization. *Trends Pharmacol Sci* 2005;**26**:155-161.
- Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:209-218.
- Delpón E, Tamargo J. Electrofisiología cardíaca. En: *Fisiología Humana*. Tresguerres JAF. McGraw-Hill 2010.
- Demuth DG, Molleman A. Cannabinoid signalling. *Life Sci* 2006;**78**:549-563.
- Dennis A, Wang L, Wan X, Ficker E. hERG channel trafficking: Novel targets in drug-induced long QT syndrome. *Biochem Soc Trans* 2007;**35**:1060-1063.
- Derkinderen P, Ledent C, Parmentier M, Girault JA. Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1

- p receptors in hippocampus.
- J Neurochem*
- 2001;
- 77**
- :957-960.
- Deschênes I, Tomaselli GF. Modulation of Kv4.3 current by accessory subunits. *FEBS Lett* 2002;**528**:183-188.
- Deschênes I, Arroudass AA, Jones SP, Tomaselli GF. Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Navβ1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na⁺ and I_{to} currents. *J Mol Cell Cardiol* 2008;**45**:336-346.
- Deutsch DG, Chin SA. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol* 1993;**46**:791-796.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992;**258**:1946-1949.
- Devaux M, Sassi F. Social inequalities in obesity and overweight in 11 OECD countries. *Eur J Public Health* 2013;**23**:464-469.
- Dhamoon AS, Jalife J. The inward rectifier current I_{K1} controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2005;**2**:316-324.
- Di Diego JM, Cordeiro JM, Goodrow RJ, Fish JM, Zygmunt AC, Pérez GJ, Scornik FS, Antzelevitch C. Ionic and cellular basis for the predominance of the Brugada syndrome phenotype in males. *Circulation* 2002;**106**:2004-2011.
- Di Francesco D. The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity. *Circ Res.* 2010;**106**:434-446.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 1994;**372**:686-691.
- Di Marzo V, Deutsch DG. Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 1998;**5**:386-404.
- Di Marzo V. Biosynthesis and inactivation of endocannabinoids: relevance to their proposed role as neuromodulators. *Life Sci* 1999;**65**:645-655.
- Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 2000;**75**:2434-2444.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. Endocannabinoids Part I: molecular basis of endocannabinoid formation, action and inactivation and development of selective inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 2001;**5**:241-265.
- Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004;**3**:771-784.
- Di Marzo V, Petrocellis LD. Plant, synthetic, and endogenous cannabinoids in medicine. *Annu Rev Med* 2006;**57**:553-574.
- Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and the regulation of their levels in health and disease. *Curr Opin Lipidol* 2007;**18**:129-140.
- Di Marzo V, Maccarrone M. FAAH and anandamide: is 2-AG really the odd one out? *Trends Pharmacol Sci* 2008;**29**:229-233.
- Di Marzo V, Piscitelli F, Mechoulam R. Cannabinoids and endocannabinoids in metabolic disorders with focus on diabetes. *Handb Exp Pharmacol* 2011;**203**:75-104.
- Díaz-Laviada I, Ruiz-Llorente L. Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini Rev Med Chem* 2005;**5**:619-630.
- Dilks D, Ling HP, Cockett M, Sokol P, Numann R. Cloning and expression of the human Kv4.3 potassium channel. *J Neurophysiol* 1999;**81**:1974-1977.
- Dixon JE, Shi W, Wang HS, McDonald C, Yu H,

- Wymore RS, Cohen IS, McKinnon D. Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res* 1996;**79**:659-668.
- Dobrev D, Graf E, Wettwer E, Himmel HM, Hála O, Doerfel C, Christ T, Schüler S, Ravens U. Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K(+) current (I(K,ACh) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced I(K,ACh) and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* 2001;**104**:2551-2557.
- Dobrev D, Ravens U. Remodeling of cardiomyocyte ion channels in human atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2003;**98**:137-148.
- Dobrev D. Electrical remodeling in atrial fibrillation. *Herz* 2006;**31**:108-112.
- Doggrell SA, Hancox JC. Dronedaron: an amiodarone analogue. *Expert Opin Investig Drugs* 2004;**13**:415-426.
- Dorian P, Pinter A, Mangat I, Korley V, Cvitkovic SS, Beatch GN. The effect of vernakalant (RSD1235), an investigational antiarrhythmic agent, on atrial electrophysiology in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;**50**:35-40.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998;**280**:69-77.
- Drolet B, Simard C, Mizoue L, Roden DM. Human cardiac potassium channel DNA polymorphism modulates access to drug binding site and causes drug resistance. *J Clin Invest* 2005;**115**:2209-2213.
- Duan Y, Liao C, Jain S, Nicholson RA. The cannabinoid receptor agonist CP-55,940 and ethyl arachidonate interfere with [(3)H]batrachotoxinin A 20 alpha-benzoate binding to sodium channels and inhibit sodium channel function. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2008;**148**:244-249.
- Dublin S, French B, Glazer NL, Wiggins KL, Lumley T, Psaty BM, Smith NL, Heckbert SR. Risk of new-onset atrial fibrillation in relation to body mass index. *Arch Intern Med* 2006;**166**:2322-2328.
- Eaholtz G, Scheuer T, Catterall WA. Restoration of inactivation and block of open sodium channels by an inactivation gate peptide. *Neuron* 1994;**12**:1041-1048.
- Eldstrom J, Wang Z, Xu H, Pourrier M, Ezrin A, Gibson K, Fedida D. The molecular basis of high-affinity binding of the antiarrhythmic compound vernakalant (RSD1235) to Kv1.5 channels. *Mol Pharmacol* 2007;**72**:1522-1534.
- Engeli S, Böhnke J, Feldpausch M, Gorzelniak K, Janke J, Bátkai S, Pacher P, Harvey-White J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J. Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity. *Diabetes* 2005;**54**:2838-2843.
- England SK, Uebele VN, Shear H, Kodali J, Bennett PB, Tamkun MM. Characterization of a voltage-gated K⁺ channel β subunit expressed in human heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;**92**:6309-6313.
- Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;**92**:3376-3380.
- Falasca M, Corda D. Elevated levels and mitogenic activity of lysophosphatidylinositol in k-ras-transformed epithelial cells. *Eur J Biochem* 1994;**221**:383-389.
- Falasca M, Silletta MG, Carvelli A, Di Francesco AL, Fusco A, Ramakrishna V, Corda D. Signalling pathways involved in the mitogenic action of lysophosphatidylinositol. *Oncogene* 1995;**10**:2113-2124.
- Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermini B, Faust F, Nattel S, Brown AM. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K⁺ channel current. *Circ Res* 1993;**73**:210-216.

- Fedida D, Maruoka ND, Lin S. Modulation of slow inactivation in human cardiac Kv1.5 channels by extra- and intracellular permeant cations. *J Physiol* 1999;**515**:315-329.
- Fedida D, Eldstrom J, Hesketh JC, Lamorgese M, Castel L, Steele DF, Van Wagoner DR. Kv1.5 is an important component of repolarizing K⁺ current in canine atrial myocytes. *Circ Res* 2003;**93**:744-751.
- Fedida D, Orth PM, Chen JY, Lin S, Plouvier B, Jung G, Ezrin AM, Beatch GN. The mechanism of atrial antiarrhythmic action of RSD1235. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005;**16**:1227-1238.
- Felder CC, Briley EM, Axelrod J, Simpson JT, Mackie K, Devane WA. Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulates receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;**90**:7656-7660.
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* 1995;**48**:443-450.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggin RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 1996;**393**:231-235.
- Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;**38**:179-200.
- Felipe A, Snyders DJ, Deal KK, Tamkun MM. Influence of cloned voltage-gated K⁺ channel expression on alanine transport, Rb⁺ uptake, and cell volume. *Am J Physiol* 1993;**265**:C1230-1238.
- Feng J, Wang Z, Li GR, Nattel S. Effects of class III antiarrhythmic drugs on transient outward and ultra-rapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1997a;**281**:384-392.
- Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 1997b;**80**:572-579.
- Feng J, Xu D, Wang Z, Nattel S. Ultrarapid delayed rectifier current inactivation in human atrial myocytes: Properties and consequences. *Am J Physiol* 1998a;**275**:H1717-H1725.
- Feng J, Yue L, Wang Z, Nattel S. Ionic mechanisms of regional action potential heterogeneity in the canine right atrium. *Circ Res* 1998b;**83**:541-551.
- Fenwick EM, Marty A, Neher E. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol (Lond.)* 1982;**331**:599-635.
- Fermini B, Wang Z, Duan D, Nattel S. Differences in rate dependence of transient outward current in rabbit and human atrium. *Am J Physiol* 1992;**263**:H1747-1754.
- Fernández-Bergés D, Cabrera de León A, Sanz H, Elosua R, Guembe MJ, Alzamora M, Vega-Alonso T, Félix-Redondo FJ, Ortiz-Marrón H, Rigo F, Lama C, Gavrila D, Segura-Fragoso A, Lozano L, Marrugat J. Metabolic syndrome in Spain: prevalence and coronary risk associated with harmonized definition and WHO proposal. DARIOS study. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2012;**65**:241-248.
- Ficker E, Taglialatela M, Wible BA, Henley CM, Brown AM. Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K⁺ channels. *Science* 1994;**266**:1068-1072.
- Finley MR, Li Y, Hua F, Lillich J, Mitchell KE, Ganta S, Gilmour RF Jr, Freeman LC. Expression and coassociation of ERG1, KCNQ1, and KCNE1 potassium channel proteins in horse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;**283**:H126-138.
- Fisar Z. Cannabinoids and atherosclerosis. *Prague Med Rep* 2009;**110**:5-12.
- Ford WR, Honan SA, White R, Hiley CR. Evidence of a novel site mediating anandamide-induced negative inotropic and coronary vasodilator responses in rat isolated hearts. *Br J Pharmacol* 2002;**135**:1191-1198.

- Ford JW, Milnes JT. New drugs targeting the cardiac ultra-rapid delayed-rectifier current (IKur): rationale, pharmacology and evidence for potential therapeutic value. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;**52**:105-120.
- Fozzard HA, January CT, Makielski JC. New studies of the excitatory sodium currents in heart muscle. *Circ Res* 1985;**56**:475-485.
- Fozzard HA, Hanck DA, Makielski JC, Scanley BE, Sheets MF. Sodium channels in cardiac Purkinje cells. *Experientia* 1987;**43**:1162-1168.
- Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci* 2003;**23**:7767-7775.
- Franqueza L, Longobardo M, Vicente J, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, Valenzuela C. Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res* 1997;**81**:1053-1064.
- Freund TF, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 2003;**83**:1017-1066.
- Fride E, Mechoulam R. Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent. *Eur J Pharmacol* 1993;**231**:313-314.
- Frost L, Hune LJ, Vestergaard P. Overweight and obesity as risk factors for atrial fibrillation or flutter: the Danish Diet, Cancer, and Health Study. *Am J Med* 2005;**118**:489-495.
- Frustaci A, Caldarulo M, Buffon A, Bellocci F, Fenici R, Melina D. Cardiac biopsy in patients with "primary" atrial fibrillation. Histologic evidence of occult myocardial diseases. *Chest* 1991;**100**:303-306.
- Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 1997;**96**:1180-1184.
- Fu J, Oveisi F, Gaetani S, Lin E, Piomelli D. Oleylethanolamide, an endogenous PPAR- α agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. *Neuropharmacology* 2005;**48**:1147-1153.
- Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC Jr, Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL; American College of Cardiology; American Heart Association Task Force; European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines; European Heart Rhythm Association; Heart Rhythm Society. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: full text: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation) developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Europace* 2006;**8**:651-745.
- Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Kay GN, Le Heuzey JY, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann LS. 2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines developed in partnership with the European Society of Cardiology and in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol* 2011;**57**:e101-198.
- Gaborit N, Steenman M, Lamirault G, Le Meur N, Le Bouter S, Lande G, Léger J, Charpentier F, Christ T, Dobrev D, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005;**112**:471-481.

- Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, Demolombe S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007;**582**:675-693.
- Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R, Grossi S, Richiardi E, Borggrefe M. Short QT syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation* 2003;**108**:965-970.
- Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 1995;**232**:54-61.
- Galve-Roperh I, Rueda D, Gómez del Pulgar T, Velasco G, Guzmán M. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 2002;**62**:1385-1392.
- Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Bennett T. Complex regional haemodynamic effects of anandamide in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2002;**135**:1889-1896.
- George AL Jr. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest* 2005;**115**:1990-1999.
- Gérard CM, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J* 1991;**279**:129-134.
- Gettes LS, Reuter H. Slow recovery from inactivation of inward currents in mammalian myocardial fibres. *J Physiol* 1974;**240**:703-724.
- Giang DK, Cravatt BF. Molecular characterization of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:2238-2242.
- Giles WR, Imaizumi Y. Comparison of potassium currents in rabbit atrial and ventricular cells. *J Physiol* 1988;**405**:123-145.
- Gintant GA, Datyner NB, Cohen IS. Slow inactivation of a tetrodotoxin-sensitive current in canine cardiac Purkinje fibers. *Biophys J* 1984;**45**:509-512.
- Glass M, Dragunow M, Faull RL. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience* 1997;**77**:299-318.
- Glass M, Felder CC. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 1997;**17**:5327-5333.
- Godlewski G, Offertaler L, Wagner JA, Kunos G. Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009;**89**:105-111.
- Godreau D, Vranckx R, Maguy A, Rücker-Martin C, Goyenvalle C, Abdelshafy S, Tessier S, Couétil JP, Hatem SN. Expression, regulation and role of the MAGUK protein SAP-97 in human atrial myocardium. *Cardiovasc Res* 2002;**56**:433-442.
- Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ. Electrical remodeling in atrial fibrillation. Time course and mechanisms. *Circulation* 1996;**94**:2968-2974.
- Goette A, Lendeckel U. Nonchannel drug targets in atrial fibrillation. *Pharmacol Ther* 2004;**102**:17-36.
- Gögelein H, Brendel J, Steinmeyer K, Strübing C, Picard N, Rampe D, Kopp K, Busch AE, Bleich M. Effects of the atrial antiarrhythmic drug AVE0118 on cardiac ion channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004a;**370**:183-192.
- Gögelein H, Brendel J, Bleich M. Novel atrial K channel blockers AVE3295 and AVE1231 for prevention of recurrence of atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2004b;**1**:S103.
- Goldin AL. Evolution of voltage-gated Na⁺ channels. *J Exp Biol* 2002;**205**:575-584.
- Goldman DE. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J Gen Physiol*

- 1943;**27**:37-60.
- Gómez R, Núñez L, Caballero R, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E. Spironolactone and its main metabolite canrenoic acid block hKv1.5, Kv4.3 and Kv7.1 + minK channels. *Br J Pharmacol* 2005;**146**:146-161.
- Gómez R, Caballero R, Barana A, Amorós I, Calvo E, López JA, Klein H, Vaquero M, Osuna L, Atienza F, Almendral J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide increases cardiac I_{K1} by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. *Circ Res* 2009;**105**:383-392.
- Gómez-Doblas JJ, Muñiz J, Martín JJ, Rodríguez-Roca G, Lobos JM, Awamleh P, Permanyer-Miralda G, Chorro FJ, Anguita M, Roig E; en representación de los colaboradores del estudio OFRECE. Prevalence of Atrial Fibrillation in Spain. OFRECE Study Results. *Rev Esp Cardiol* 2013 doi: 10.1016/j.recesp.2013.07.015.
- Gómez-Lagunas F, Armstrong CM. Inactivation in ShakerB K^+ channels: a test for the number of inactivating particles on each channel. *Biophys J* 1995;**68**:89-95.
- Gómez Del Pulgar T, De Ceballos ML, Guzmán M, Velasco G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 2002;**277**:36527-36533.
- Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol* 2000;**57**:1045-1050.
- González T, Navarro-Polanco R, Arias C, Caballero R, Moreno I, Delpón E, Tamargo J, Tamkun MM, Valenzuela C. Assembly with the Kv β 1.3 subunit modulates drug block of hKv1.5 channels. *Mol Pharmacol* 2002;**62**:1456-1463.
- González de la Fuente M, Barana A, Gómez R, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Sacristán S, Atienza F, Pita A, Pinto A, Fernández-Avilés F, Caballero R, Tamargo J, Delpón E. Chronic Atrial Fibrillation Up-regulates β 1-adrenoceptors Affecting Repolarizing Currents and Action Potential Duration. *Cardiovasc Res* 2013;**97**:379-388.
- Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1999;**57**:417-423.
- Grainger J, Boachie-Ansah G. Anandamide-induced relaxation of sheep coronary arteries: the role of the vascular endothelium, arachidonic acid metabolites and potassium channels. *Br J Pharmacol* 2001;**134**:1003-1012.
- Grammer JB, Bosch RF, Kühlkamp V, Seipel L. Molecular remodeling of Kv4.3 potassium channels in human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;**11**:626-633.
- Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *J Clin Invest* 2002;**110**:1201-1209.
- Griffin G, Atkinson PJ, Showalter VM, Martin BR, Abood ME. Evaluation of cannabinoid receptor agonists and antagonists using the guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)-triphosphate binding assay in rat cerebellar membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;**285**:553-560.
- Griffin G, Tao Q, Abood ME. Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;**292**:886-894.
- Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy G. Pharmacological characterization of five cloned voltage gated K^+ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 1994;**45**:1227-1234.
- Guindon J, Hohmann AG. A physiological role for endocannabinoid-derived products of cyclooxygenase-2-mediated oxidative metabolism. *Br J Pharmacol* 2008;**153**:1341-1343.

- Guizy M, David M, Arias C, Zhang L, Cofán M, Ruiz-Gutiérrez V, Ros E, Lillo MP, Martens JR, Valenzuela C. Modulation of the atrial specific Kv1.5 channel by the n-3 polyunsaturated fatty acid, alpha-linolenic acid. *J Mol Cell Cardiol* 2008;**44**:323-335.
- Guo W, Kamiya K, Kada K, Kodama I, Toyama J. Regulation of cardiac Kv1.5 K⁺ channel expression by cardiac fibroblasts and mechanical load in cultured newborn rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1998;**30**:157-166.
- Guo J, Ikeda SR. Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol* 2004;**65**:665-674.
- Gussak I, Brugada P, Brugada J, Wright RS, Kopecky SL, Chaitman BR, Bjerregaard P. Idiopathic short QT interval: a new clinical syndrome? *Cardiology* 2000;**94**:99-102.
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stühmer W, Wang X. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:473-508.
- Guzmán M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**:745-755.
- Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* 1988;**395**:233-53.
- Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998;**339**:659-666.
- Hájos N, Kathuria S, Dinh T, Piomelli D, Freund TF. Endocannabinoid transport tightly controls 2-arachidonoyl glycerol actions in the hippocampus: effects of low temperature and the transport inhibitor AM404. *Eur J Neurosci* 2004;**19**:2991-2996.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981;**391**:85-100.
- Hampson RE, Evans GJ, Mu J, Zhuang SY, King VC, Childers SR, Deadwyler SA. Role of cyclic AMP dependent protein kinase in cannabinoid receptor modulation of potassium "A-current" in cultured rat hippocampal neurons. *Life Sci* 1995;**56**:2081-2088.
- Hancox JC, Levi AJ, Witchel HJ. Time course and voltage dependence of expressed HERG current compared with native "rapid" delayed rectifier K⁺ current during the cardiac ventricular action potential. *Pflugers Arch* 1998;**436**:843-853.
- Hansen HS. Palmitoylethanolamide and other anandamide congeners. Proposed role in the diseased brain. *Exp Neurol* 2010;**224**:48-55.
- Hart RG, Halperin JL. Atrial fibrillation and stroke : concepts and controversies. *Stroke*. 2001;**32**:803-808.
- Hattori T, Makiyama T, Akao M, Ehara E, Ohno S, Iguchi M, Nishio Y, Sasaki K, Itoh H, Yokode M, Kita T, Horie M, Kimura T. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res* 2012;**93**:666-673.
- Haverkamp W, Breithardt G, Camm AJ, Janse MJ, Rosen MR, Antzelevitch C, Escande D, Franz M, Malik M, Moss A, Shah R. The potential for QT prolongation and pro-arrhythmia by non-anti-arrhythmic drugs: clinical and regulatory implications. Report on a Policy Conference of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res* 2000;**47**:219-233.
- He M, Bodi I, Mikala G, Schwartz A. Motif III S5 of L-type calcium channels is involved in the dihydropyridine binding site. A combined radioligand binding and

- p electrophysiological study.
- J Biol Chem*
- 1997;
- 272**
- :2629-2633.
- Hedin KE, Lim NF, Clapham DE. Cloning of a *Xenopus laevis* inwardly rectifying K⁺ channel subunit that permits GIRK1 expression of I_{K,Ach} currents in oocytes. *Neuron* 1996;**16**:423-429.
- Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker BH, Stijnen T, Lip GY, Wittman JC. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *Eur Heart J* 2006;**27**:949-953.
- Heginbotham L, Lu Z, Abramson R, MacKinnon R. Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys J* 1994;**66**:1061-1067.
- Heinemann SH, Terlau H, Stühmer W, Imoto K, Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* 1992;**356**:441-443.
- Henry WL, Morganroth J, Pearlman AS, Clark CE, Redwood DR, Itscoitz SB, Epstein SE. Relation between echocardiographically determined left atrial size and atrial fibrillation. *Circulation* 1976;**53**:273-279.
- Henry DJ, Chavkin C. Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 1995;**186**:91-94.
- Henstridge CM, Balenga NA, Ford LA, Ross RA, Waldhoer M, Irving AJ. The GPR55 ligand L- α -lysophosphatidylinositol promotes RhoA-dependent Ca²⁺ signaling and NFAT activation. *FASEB J* 2009;**23**:183-193.
- Henstridge CM, Balenga NA, Schröder R, Kargl JK, Platzer W, Martini L, Arthur S, Penman J, Whistler JL, Kostenis E, Waldhoer M, Irving AJ. GPR55 ligands promote receptor coupling to multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol* 2010;**160**:604-614.
- Hering S, Aczél S, Grabner M, Döring F, Berjukow S, Mitterdorfer J, Sinnegger MJ, Striessnig J, Degtiar VE, Wang Z, Glossmann H. Transfer of high sensitivity for benzothiazepines from L-type to class A (BI) calcium channels. *J Biol Chem* 1996;**271**:24471-24475.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 1991;**11**:563-583.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 2010;**90**:291-366.
- Hiley CR. Endocannabinoids and the heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;**53**:267-276.
- Hillard CJ, Edgemond WS, Jarrahan A, Campbell WB. Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 1997;**69**:631-638.
- Hillard CJ. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000;**61**:3-18.
- Hillard CJ, Jarrahan A. The movement of N-arachidonylethanolamine (anandamide) across cellular membranes. *Chem Phys Lipids* 2000;**108**:123-134.
- Hille B. (Ed.). *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3^a Edición. Ed. Sinauer Associates. Sunderland, MA (USA). 2001.
- Hiraoka M, Kawano S. Calcium-sensitive and insensitive transient outward current in rabbit ventricular myocytes. *J Physiol* 1989; **410**:187-212.
- Hirschberg B, Rovner A, Lieberman M, Patlak J. Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels. *J Gen Physiol* 1995; **106**:1053-1068.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993; **362**:31-38.

- Ho WS, Hiley CR. Endothelium-independent relaxation to cannabinoids in rat-isolated mesenteric artery and role of Ca²⁺ influx. *Br J Pharmacol* 2003;**139**:585-597.
- Hobbs WJ, Fynn S, Todd DM, Wolfson P, Galloway M, Garratt CJ. Reversal of atrial electrical remodeling after cardioversion of persistent atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2000;**101**:1145-1151.
- Hocini M, Ho SY, Kawara T, Linnenbank AC, Potse M, Shah D, Jaïs P, Janse MJ, Haïssaguerre M, De Bakker JM. Electrical conduction in canine pulmonary veins: electrophysiological and anatomic correlation. *Circulation* 2002;**105**:2442-2448.
- Hockerman GH, Johnson BD, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 1995;**270**:22119-22122.
- Hockerman GH, Johnson BD, Abbott MR, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of high affinity phenylalkylamine block of L-type calcium channels in transmembrane segment IIIS6 and the pore region of the $\alpha 1$ subunit. *J Biol Chem* 1997;**272**:18759-18765.
- Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 1952a; **117**:500-544.
- Hodgkin AL, Huxley AF. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol* 1952b; **116**:473-496.
- Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of giant axon of the squid. *J Physiol* 1949; **108**:37-77.
- Hodgson-Zingman DM, Karst ML, Zingman LV, Heublein DM, Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, de Andrade M, Burnett JC Jr, Olson TM. Atrial natriuretic peptide frameshift mutation in familial atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2008;**359**:158-165.
- Hoffman B, Cranefield P. *Electrophysiology of the heart*. Ed. McGraw-Hill. 1960.
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V. Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci* 1994; **17**:399-418.
- Hoffman AF, Lupica CR. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci* 2000;**20**:2470-2479.
- Hoffman AF, Macgill AM, Smith D, Oz M, Lupica CR. Species and strain differences in the expression of a novel glutamate-modulating cannabinoid receptor in the rodent hippocampus. *Eur J Neurosci* 2005;**22**:2387-2391.
- Högestätt ED, Zygmunt PM. Cardiovascular pharmacology of anandamide. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;**66**:343-351.
- Holmes TC, Fadool DA, Ren R, Levitan IB. Association of Src tyrosine kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. *Science* 1996;**274**:2089-2091.
- Holmqvist MH, Cao J, Knoppers MH, Jurman ME, Distefano PS, Rhodes KJ, Xie Y, An WF. Kinetic modulation of Kv4-mediated A-current by arachidonic acid is dependent on potassium channel interacting proteins. *J Neurosci* 2001;**21**(12):4154-4161.
- Hondeghem LM. Validity of V_{max} as a measure of the sodium current in cardiac and nervous tissues. *Biophys J* 1978; **23**:147-152.
- Hondeghem LM y Katzung BG. Time- and voltage-dependent interactions of antiarrhythmic drugs with cardiac sodium channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1977;**472**:373-398.
- Hong K, Bjerregaard P, Gussak I, Brugada R. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in KCNH2. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005; **4**:394-396.
- Honoré E, Barhanin J, Attali B, Lesage F, Lazdunski M. External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K⁺ channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;**91**:1937-1941.
- Horie M, Irisawa H, Noma A. Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel

- in guinea-pig ventricular cells. *J Physiol* 1987; **387**:251-272.
- Horn R, Patlak J, Stevens CF. Sodium channels need not open before they inactivate. *Nature* 1981; **291**:426-427.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 1990; **250**:533-538.
- Hoshi T, Zagotta WN, Aldrich RW. Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron* 1991; **7**:547-556.
- Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 1986; **29**:307-313.
- Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology XXVII Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; **54**:161-202.
- Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 2004; **47**:345-358.
- Huang CL, Slesinger PA, Casey PJ, Jan NY, Jan LY. Evidence that direct binding of Gbg to the GIRK1 G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel is important for channel activation. *Neuron* 1995; **15**:1133-1143.
- Huang B, Qin D, El-Sherif N. Early down-regulation of K⁺ channel genes and currents in the postinfarction heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000; **11**:1252-1261.
- Irisawa G, Hagiwara N. Pacemaker mechanism of mammalian sinoatrial node cells. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1988; **275**:33-52.
- Isacoff EY, Jan YN, Jan LY. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K⁺ channel. *Nature* 1991; **353**:86-90.
- Isenberg G, Klockner U. Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude. *Pflügers Arch* 1982; **395**:30-41.
- Isom LL, Catterall WA. Na⁺ channel subunits and Ig domains. *Nature* 1996; **383**:307-308.
- Iversen L. Cannabis and the brain. *Brain* 2003; **126**:1252-1270.
- Jaggari SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS. The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain* 1998; **76**:189-199.
- Jalife J, Berenfeld O, Mansour M. Mother rotors and fibrillatory conduction: a mechanism of atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002; **54**:204-216.
- Jalife J. Déjà vu in the theories of atrial fibrillation dynamics. *Cardiovasc Res* 2011; **89**:766-775.
- Jan LY, Barbel S, Timpe L, Laffer C, Salkoff L, O'Farrell P, Jan YN. Mutating a gene for a potassium channel by hybrid dysgenesis: an approach to the cloning of the Shaker locus in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1983; **48**:233-45.
- Jangsangthong W, Kuzmenkina E, Khan IF, Matthes J, Hullin R, Herzig S. Inactivation of L-type calcium channels is determined by the length of the N terminus of mutant beta(1) subunits. *Pflügers Arch* 2010; **459**:399-411.
- Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:14136-14141.
- Járai Z, Wagner JA, Goparaju SK, Wang L, Razdan RK, Sugiura T, Zimmer AM, Bonner TI, Zimmer A, Kunos G. Cardiovascular

- p effects of 2-arachidonoyl glycerol in anesthetized mice.
- Hypertension*
- 2000;
- 35**
- :679-684.
- Jarrahan A, Hillard CJ. Arachidonylethanolamide (anandamide) binds with low affinity to dihydropyridine binding sites in brain membranes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;**57**:551-554.
- Jarrahan A, Manna S, Edgemond WS, Campbell WB, Hillard CJ. Structure-activity relationships among N-arachidonylethanolamine (Anandamide) head group analogues for the anandamide transporter. *J Neurochem* 2000;**74**:2597-25606.
- Jerng HH, Qian Y, Pfaffinger PJ. Modulation of Kv4.2 channel expression and gating by dipeptidyl peptidase 10 (DPP10). *Biophys J* 2004; **87**:2380-2396.
- Jespersen T, Grunnet M, Olesen SP. The KCNQ1 potassium channel: from gene to physiological function. *Physiology* 2005; **20**:408-416.
- Ji S, John SA, Lu Y, Weiss JN. Mechanosensitivity of the cardiac muscarinic potassium channel. A novel property conferred by Kir3.4 subunit. *J Biol Chem* 1998; **273**:1324-1328.
- Jiang M, Cabo C, Yao J, Boyden PA, Tseng G. Delayed rectifier K⁺ currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovasc Res* 2000; **48**:34-43.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 2002a; **417**:515-522.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 2002b; **417**:523-526.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003a; **423**:33-41.
- Jiang Y, Ruta V, Chen J, Lee A, MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 2003b; **423**:42-48.
- Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002;**298**:1911-1912.
- Jones RT. Cardiovascular system effects of marijuana. *J Clin Pharmacol* 2002;**42**:58S-63S.
- Jones E, Roti Roti EC, Wang J, Delfosse SA, Robertson GA. Cardiac I_{Kr} channels minimally comprise hERG 1a and 1b subunits. *J Biol Chem* 2004; **279**:44690-44694.
- Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Tiger G, Fowler CJ. Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol* 2001;**133**:1263-1275.
- Josephson IR, Sánchez-Chapula J, Brown AM. Early outward current in rat single ventricular cells. *Circ Res* 1984; **54**:157-162.
- Joyeux M, Arnaud C, Godin-Ribuot D, Demenge P, Lamontagne D, Ribuot C. Endocannabinoids are implicated in the infarct size-reducing effect conferred by heat stress preconditioning in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res* 2002;**55**:619-625.
- Jurkiewicz NK, Sanguinetti MC. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a metanotosulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res* 1993; **72**:75-83.
- Käab S, Dixon J, Duc J, Ashen D, Näbauer M, Beuckelmann DJ, Steinbeck G, McKinnon D, Tomaselli GF. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation* 1998; **98**:1383-1393.
- Kaczocha M, Glaser ST, Deutsch DG. Identification of intracellular carriers for

- the endocannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:6375-6380.
- Kalifa J, Tanaka K, Zaitsev AV, Warren M, Vaidyanathan R, Auerbach D, Pandit S, Vikstrom KL, Ploutz-Snyder R, Talkachou A, Atienza F, Guiraudon G, Jalife J, Berenfeld O. Mechanisms of wave fractionation at boundaries of high-frequency excitation in the posterior left atrium of the isolated sheep heart during atrial fibrillation. *Circulation* 2006;**113**:626-633.
- Kang MG, Campbell KP. Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 2003; **278**:21315-8.
- Kankaanpää M, Lehto HR, Pärkkä JP, Komu M, Viljanen A, Ferrannini E, Knuuti J, Nuutila P, Parkkola R, Iozzo P. Myocardial triglyceride content and epicardial fat mass in human obesity: relationship to left ventricular function and serum free fatty acid levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;**91**:4689-4695.
- Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev* 2009;**89**:309-380.
- Kaprielian R, Wickenden AD, Kassiri A, Parker TG, Liu PP, Backx PH. Relationship between K^+ channel down-regulation and $[Ca^{2+}]_i$ in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. *J Physiol* 1999; **517**:229-245.
- Kapur A, Zhao P, Sharir H, Bai Y, Caron MG, Barak LS, Abood ME. Atypical responsiveness of the orphan receptor GPR55 to cannabinoid ligands. *J Biol Chem* 2009;**284**:29817-29827.
- Kass RS, Moss AJ. Long QT syndrome: novel insights into the mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Clin Invest* 2003; **112**:810-815.
- Kass RS, Sanguinetti MC. Inactivation of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber. Evidence for voltage- and calcium-mediated mechanisms. *J Gen Physiol* 1984; **84**:705-26.
- Kato T, Yamashita T, Sagara K, Iinuma H, Fu LT. Progressive nature of paroxysmal atrial fibrillation. Observations from a 14-year follow-up study. *Circ J* 2004;**68**:568-572.
- Katona I, Freund TF. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med* 2008;**14**:923-930.
- Katz B. Les constantes electriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 1949;**2**:285-299.
- Kennedy ME, Nemec J, Clapham DE. Localization and interaction of epitope-tagged GIRK1 and CIR inward rectifier K^+ channel subunits. *Neuropharmacol* 1996;**35**:831-839
- Kenyon JL, Gibbons WR. 4-Aminopyridine and the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *J Gen Physiol* 1979;**73**:139-157.
- Kim YH, Lim DS, Lee JH, Shim WJ, Ro YM, Park GH, Becker KG, Cho-Chung YS, Kim MK. Gene expression profiling of oxidative stress on atrial fibrillation in humans. *Exp Mol Med* 2003;**35**:336-349.
- Kim J, Ghosh S, Nunziato DA, Pitt GS. Identification of the components controlling inactivation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Neuron* 2004a;**41**:745-754.
- Kim LA, Furst J, Butler MH, Xu S, Grigorieff N, Goldstein SA. I_{to} channels are octomeric complexes with four subunits of each Kv4.2 and K^+ channel-interacting protein 2. *J Biol Chem* 2004b;**279**:5549-54.
- Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM, Casadei B. A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ Res* 2005;**97**:629-636.
- Kim HI, Kim TH, Shin YK, Lee CS, Park M, Song JH. Anandamide suppression of Na^+ currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 2005;**1062**:39-47.
- Kin Y, Misumi Y, Ikehara Y. Biosynthesis and characterization of the brain-specific membrane protein DPPX, a dipeptidyl

- peptidase IV-related protein. *J Biochem* 2001;**129**:289-295.
- King A. Prevention: Neuropsychiatric adverse effects signal the end of the line for rimonabant. *Nat Rev Cardiol* 2010;**7**:602.
- Kinosita K Jr, Kawato S, Ikegami A. Dynamic structure of biological and model membranes: analysis by optical anisotropy decay measurement. *Adv Biophys* 1984;**17**:147-203.
- Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H. The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 2003;**74**:486-496.
- Klößner U, Mikala G, Schwartz A, Varadi G. Molecular studies of the asymmetric pore structure of the human cardiac voltage-dependent Ca^{2+} channel. Conserved residue, Glu-1086, regulates proton-dependent ion permeation. *J Biol Chem* 1996;**271**:22293-6.
- Knobloch K, Brendel J, Peukert S, Rosenstein B, Busch AE, Wirth KJ. Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the novel I(Kur) channel blockers, S9947 and S20951, on left vs. right pig atrium in vivo in comparison with the I(Kr) blockers dofetilide, azimilide, d,l-sotalol and ibutilide. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2002;**366**:482-7.
- Koch SE, Bodi I, Schwartz A, Varadi G. Architecture of Ca^{2+} channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem* 2000;**275**:34493-500.
- Kogan NM, Mechoulam R. Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin Neurosci* 2007;**9**:413-430.
- Kong W, Po S, Yamagishi T, Ashen MD, Stetten G, Tomaselli GF. Isolation and characterization of the human gene encoding I_{to} : further diversity by alternative mRNA splicing. *Am J Physiol* 1998;**275**:H1963-H1970.
- Konrad RJ, Major CD, Wolf BA. Diacylglycerol hydrolysis to arachidonic acid is necessary for insulin secretion from isolated pancreatic islets: sequential actions of diacylglycerol and monoacylglycerol lipases. *Biochemistry* 1994;**33**:13284-13294.
- Kourliouros A, Savelieva I, Kiotsekoglou A, Jahangiri M, Camm J. Current concepts in the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* 2009;**157**:243-252.
- Krapivinsky G, Gordon EA, Wickman K, Velimirović B, Krapivinsky L, Clapham DE. The G-protein-gated atrial K^{+} channel I_{KACH} is a heteromultimer of two inwardly rectifying K^{+} -channel proteins. *Nature* 1995;**374**:135-141.
- Kreusch A, Pfaffinger PJ, Stevens CF, Choe S. Crystal structure of the tetramerization domain of the Shaker potassium channel. *Nature* 1998;**392**:945-948.
- Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, Lip GY, Franco OH, Hofman A, Witteman JC, Stricker BH, Heeringa J. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J* 2013;**34**:2746-2751.
- Krogh-Madsen T, Abbott GW, Christini DJ. Effects of electrical and structural remodeling on atrial fibrillation maintenance: a simulation study. *PLoS Comput Biol* 2012;**8**:e1002390.
- Kubo Y, Adelman JP, Clapham DE, Jan LY, Karschin A, Kurachi Y, Lazdunski M, Nichols CG, Seino S, Vandenberg CA. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 2005;**57**:509-526.
- Kumagai K, Akimitsu S, Kawahira K, Kawanami F, Yamanouchi Y, Hiroki T, Arakawa K. Electrophysiological properties in chronic lone atrial fibrillation. *Circulation* 1991;**84**:1662-1668.
- Kuo HC, Cheng CF, Clark RB, Lin JJ, Lin JL, Hoshijima M, Nguyen-Tran VT, Gu Y, Ikeda Y, Chu PH, Ross J, Giles WR, Chien KR. A defect in the Kv channel-interacting protein 2 (KCHIP2) gene leads to a complete loss of I_{to} and confers susceptibility to ventricular tachycardia. *Cell* 2001;**107**:801-813.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe

- ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 2003;**300**:1922-1926.
- Kuo A, Domene C, Johnson LN, Doyle DA, Vénien-Bryan C. Two different conformational states of the KirBac3.1 potassium channel revealed by electron crystallography. *Structure* 2005;**13**:1463-1472.
- Kupersmidt S, Yang T, Anderson ME, Wessels A, Niswender KD, Magnuson MA, Roden DM. Replacement by homologous recombination of the minK gene with lacZ reveals restriction of minK expression to the mouse cardiac conduction system. *Circ Res* 1999;**84**:146-152.
- Kurachi Y, Nakajima T, Sugimoto T. Short-term desensitization of muscarinic K⁺ channel current in isolated atrial myocytes and possible role of GTP-binding proteins. *Pflügers Arch* 1987;**410**:227-233.
- Kurata HT, Doerksen KW, Eldstrom JR, Rezazadeh S, Fedida D. Separation of P/C- and U-type inactivation pathways in Kv1.5 potassium channels. *J Physiol* 2005;**568**:31-46.
- Kurata HT, Fedida D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;**92**:185-208.
- Kurokawa J, Abriel H, Kass RS. Molecular basis of the delayed rectifier current I_{Ks} in heart. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:873-882.
- Kuryshv YA, Gudzi TI, Brown AM, Wible BA. KChAP as a chaperone for specific K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;**278**:C931-41.
- Kwak YG, Hu N, Wei J, George AL Jr, Grobaski TD, Tamkun MM, Murray KT. Protein kinase A phosphorylation alters Kvβ1.3 subunit-mediated inactivation of the Kv1.5 potassium channel. *J Biol Chem* 1999;**274**:13928-13932.
- Lagneux C, Lamontagne D. Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 2001;**132**:793-796.
- Lagrutta A, Wang J, Fermini B, Salata JJ. Novel, potent inhibitors of human Kv1.5 K⁺ channels and ultrarapidly activating delayed rectifier potassium current. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;**317**:1054-1063.
- Lai LP, Su MJ, Lin JL, Lin FY, Tsai CH, Chen YS, Tseng YZ, Lien WP, Huang SK. Changes in the mRNA levels of delayed rectifier potassium channels in human atrial fibrillation. *Cardiology* 1999;**92**:248-255.
- Lai LP, Su MJ, Lin JL, Tsai CH, Lin FY, Chen YS, Hwang JJ, Huang SK, Tseng YZ, Lien WP. Measurement of funny current (I_f) channel mRNA in human atrial tissue: correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999b;**10**:947-953.
- Lake KD, Martin BR, Kunos G, Varga K. Cardiovascular effects of anandamide in anesthetized and conscious normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 1997;**29**:1204-1210.
- Lalik PH, Krafte DS, Volberg WA, Ciccarelli RB. Characterization of endogenous sodium channel gene expressed in Chinese hamster ovary cells. *Am J Physiol* 1993;**264**:C803-809.
- Lambert DM, Di Marzo V. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem* 1999;**6**:757-773.
- Lauckner JE, Hille B, Mackie K. The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:19144-19149.
- Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:2699-2704.
- Lauffer LM, Iakubov R, Brubaker PL. GPR119 is essential for oleoylethanolamide-induced glucagon-like peptide-1 secretion from the intestinal enteroendocrine L-cell. *Diabetes* 2009;**58**:1058-1066.
- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petit F, Aubert JF, Beslot F, Böhme GA, Imperato A,

- Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 1999;**283**:401-404.
- Lee KS, Marban E, Tsien RW. Inactivation of calcium channels in mammalian heart cells: joint dependence on membrane potential and intracellular calcium. *J Physiol* 1985;**364**:395-411.
- Lee TE, Philipson LH, Nelson DJ. N-type inactivation in the mammalian Shaker K⁺ channel Kv1.4. *J Membr Biol* 1996;**151**:225-235.
- Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KvLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 1997;**15**:181-185.
- Lee GY, Shin YK, Lee CS, Song JH. Effects of arachidonic acid on sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res* 2002;**950**:95-102.
- Lépicier P, Bouchard JF, Lagneux C, Lamontagne D. Endocannabinoids protect the rat isolated heart against ischaemia. *Br J Pharmacol* 2003;**139**:805-815.
- Lépicier P, Bibeau-Poirier A, Lagneux C, Servant MJ, Lamontagne D. Signaling pathways involved in the cardioprotective effects of cannabinoids. *J Pharmacol Sci* 2006;**102**:155-166.
- Lesage F, Guillemare E, Fink M, Duprat F, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J* 1996;**15**:1004-11.
- Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;**279**:F793-801.
- Levitan ES, Gealy R, Trimmer JS, Takimoto K. Membrane depolarization inhibits Kv1.5 voltage-gated K⁺ channel gene transcription and protein expression in pituitary cells. *J Biol Chem* 1995;**270**:6036-6041.
- Lévy S, Maarek M, Coumel P, Guize L, Lekieffre J, Medvedowsky JL, Sebaoun A. Characterization of different subsets of atrial fibrillation in general practice in France: the ALFA study. The College of French Cardiologists. *Circulation* 1999;**99**:3028-3035.
- Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, Nattel S. Evidence for two components of delayed rectifier K⁺ current in human ventricular myocytes. *Circ Res* 1996a;**78**:689-696.
- Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B, Nattel S. Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in human atrial myocytes. *Circ Res* 1996b;**78**:903-915.
- Li GR, Wang HB, Qin GW, Jin MW, Tang Q, Sun HY, Du XL, Deng XL, Zhang XH, Chen JB, Chen L, Xu XH, Cheng LC, Chiu SW, Tse HF, Vanhoutte PM, Lau CP. Acacetin, a natural flavone, selectively inhibits human atrial repolarization potassium currents and prevents atrial fibrillation in dogs. *Circulation* 2008;**117**:2449-2457.
- Li HL, Qu YJ, Lu YC, Bondarenko VE, Wang S, Skerrett IM, Morales MJ. DPP10 is an inactivation modulatory protein of Kv4.3 and Kv1.4. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;**291**:C966-76.
- Li Q, Ma HJ, Zhang H, Qi Z, Guan Y, Zhang Y. Electrophysiological effects of anandamide on rat myocardium. *Br J Pharmacol* 2009;**158**:2022-9.
- Li Q, Ma HJ, Song SL, Shi M, Ma HJ, Li DP, Zhang Y. Effects of anandamide on potassium channels in rat ventricular myocytes: a suppression of I(to) and augmentation of K(ATP) channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;**302**:C924-930.
- Liman ER, Hess P, Weaver F, Koren G. Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel. *Nature* 1991;**353**:752-6.
- Lin S, Khanolkar AD, Fan P, Goutopoulos A, Qin C, Papahadjis D, Makriyannis A. Novel analogues of arachidonylethanolamide(anandamide):affinities for the CB1and CB2 cannabinoid receptors and metabolic stability. *J Med Chem* 1998;**41**:5353-5361.

- Lip GY, Tse HF, Lane DA. Atrial fibrillation. *Lancet* 2012;**379**:648-661.
- Litovsky SH, Antzelevitch C. Transient outward current prominent in canine ventricular epicardium but not endocardium. *Circ Res* 1988;**62**:116-126
- Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G. Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 2000;**346**:835-840.
- Liu GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seeböhm G, Brüggemann A, Kummer W, Veh RW, Daut J, Preisig-Müller R. Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K⁺ channels from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol* 2001;**532**:115-126.
- Lo Verme J, Fu J, Astarita G, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- α mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide. *Mol Pharmacol* 2005;**67**:15-19.
- Logothetis DE, Jin T, Lupyan D, Rosenhouse-Dantsker A. Phosphoinositidemediated gating of inwardly rectifying K(+) channels. *Pflugers Arch* 2007;**455**:83-95.
- Lograno MD, Romano MR. Cannabinoid agonists induce contractile responses through Gi/o-dependent activation of phospholipase C in the bovine ciliary muscle. *Eur J Pharmacol* 2004;**494**:55-62.
- London B, Trudeau MC, Newton KP, Beyer AK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Satler CA, Robertson GA. Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K⁺ current. *Circ Res* 1997;**81**:870-878.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 2005a;**309**:897-903.
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R. Voltage sensor of Kv1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 2005b;**309**:903-8.
- Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* 1994;**372**:366-369.
- Lopatin AN, Nichols CG. Inward rectifiers in the heart: an update on I_{K1}. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:625-38.
- Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron* 2002;**34**:933-944.
- Lopes CM, Remon JJ, Matavel A, Sui JL, Keselman I, Medei E, Shen Y, Rosenhouse-Dantsker A, Rohacs T, Logothetis DE. Protein kinase A modulates PLC-dependent regulation and PIP₂-sensitivity of K⁺ channels. *Channels* 2007;**1**:124-134.
- López-Barneo J, Hoshi T, Heinemann SH, Aldrich RW. Effects of external cations and mutations in the pore region on C-type inactivation of Shaker potassium channels. *Receptors Channels* 1993;**1**:61-71.
- Luk T, Jin W, Zvonok A, Lu D, Lin XZ, Chavkin C, Makriyannis A, Mackie K. Identification of a potent and highly efficacious, yet slowly desensitizing CB1 cannabinoid receptor agonist. *Br J Pharmacol* 2004;**142**:495-500.
- Lundby A, Olesen SP. KCNE3 is an inhibitory subunit of the Kv4.3 potassium channel. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;**346**:958-967.
- Lundquist AL, Manderfield LJ, Vanoye CG, Rogers CS, Donahue BS, Chang PA, Drinkwater DC, Murray KT, George AL Jr. Expression of multiple KCNE genes in human heart may enable variable modulation of I_{Ks}. *J Mol Cell Cardiol* 2005;**38**:277-287.
- Maccarrone M, van der Stelt M, Rossi A, Veldink GA, Vliegthart JF, Agrò AF. Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem* 1998;**273**:32332-32339.

- Maccarrone M, Bari M, Lorenzon T, Bisogno T, Di Marzo V, Finazzi-Agrò A. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide. *J Biol Chem* 2000;**275**:13484-13492.
- Maccarrone M, Cartoni A, Parolaro D, Margonelli A, Massi P, Bari M, Battista N, Finazzi-Agrò A. Cannabimimetic activity, binding, and degradation of stearoylethanolamide within the mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 2002;**21**:126-140.
- Maccarrone M. Endocannabinoids and reproductive endocrinology. *Curr Opin Investig Drugs* 2009;**10**:305-310.
- Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem Sci* 2010;**35**:601-608.
- MacKinnon R, Yellen G. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science* 1990;**250**:276-279.
- MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991;**350**:232-235.
- MacKinnon R, Aldrich RW, Lee AW. Functional stoichiometry of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 1993;**262**:757-759.
- MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Lett* 2003;**555**:62-65.
- Mackie K, Hille B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;**89**:3825-3829.
- Mackie K, Devane WA, Hille B. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 1993;**44**:498-503.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 1995;**15**:6552-6561.
- Mackie K. Mechanisms of CB1 receptor signaling: endocannabinoid modulation of synaptic strength. *Int J Obes* 2006;**30**:S19-23.
- Mackie K, Stella N. Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J* 2006;**8**:E298-306.
- Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol* 2008;**20**:10-14.
- Maffie J, Rudy B. Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K⁺ currents in neurons. *J Physiol* 2008;**586**:5609-5623.
- Maingret F, Patel AJ, Lazdunski M, Honoré E. The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1. *EMBO J* 2001;**20**:47-54.
- Maisel WH. Autonomic modulation preceding the onset of atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2003;**42**:1269-1270.
- Maisel WH, Stevenson LW. Atrial fibrillation in heart failure: epidemiology, pathophysiology, and rationale for therapy. *Am J Cardiol* 2003;**91**:2D-8D.
- Makielski JC, Limberis JT, Chang SY, Fan Z, Kyle JW. Coexpression of beta 1 with cardiac sodium channel alpha subunits in oocytes decreases lidocaine block. *Mol Pharmacol* 1996;**49**:30-39.
- Makita N, Bennett PB y George AL Jr. Molecular determinants of α_1 subunit-induced gating modulation in voltage-dependent Na⁺ channels. *J. Neurosci.* 1996;**16**:7117-7127.
- Makriyannis A, Tian X, Guo J. How lipophilic cannabinergic ligands reach their receptor sites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005;**77**:210-218.
- Mallat A, Lotersztajn S. Endocannabinoids and liver disease. I. Endocannabinoids and their receptors in the liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;**294**:G9-G12.
- Mandapati R, Skanes A, Chen J, Berenfeld O, Jalife J. Stable microentrant sources as a mechanism of atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2000;**101**:194-199.

- Mansour M, Mandapati R, Berenfeld O, Chen J, Samie FH, Jalife J. Left-to-right gradient of atrial frequencies during acute atrial fibrillation in the isolated sheep heart. *Circulation* 2001;**103**:2631-2636.
- Mantegazza M, Yu FH, Catterall WA, Scheuer T. Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:15348-53.
- Mark MD, Herlitz S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K^+ channels. *Eur J Biochem* 2000;**267**:5830-5836.
- Martens JR, Kwak YG, Tamkun MM. Modulation of Kv channel alpha/beta subunit interactions. *Trends Cardiovasc Med* 1999;**9**:253-258.
- Marx SO, Kurokawa J, Reiken S, Motoike H, D'Armiento J, Marks AR, and Kass RS. Requirement of a macromolecular signaling complex for β adrenergic receptor modulation of the KCNQ1-KCNE1 potassium channel. *Science* 2002;**295**:496-499.
- Massi P, Vaccani A, Parolaro D. Cannabinoids, immune system and cytokine network. *Curr Pharm Des* 2006;**12**:3135-3146.
- Mateo CR, Lillo MP, González-Rodríguez J, Acuña AU. Molecular order and fluidity of the plasma membrane of human platelets from time-resolved fluorescence depolarization. *Eur Biophys J* 1991;**20**:41-52.
- Mathie A, Woollorton JRA, Watkins CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmac* 1998;**30**:13-24.
- Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;**91**:3171-3180.
- Matsuda H, Saigusa A, Irisawa H. Ohmic conductance through the inwardly rectifying K^+ channel and blocking by internal Mg^{2+} . *Nature* 1987;**325**:156-9.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 1990;**346**:561-564.
- Matsuda T, Masumiya H, Tanaka N, Yamashita T, Tsuruzoe N, Tanaka Y, Tanaka H, Shigenoba K. Inhibition by a novel anti-arrhythmic agent, NIP-142, of cloned human cardiac K^+ channel Kv1.5 current. *Life Sci* 2001;**68**:2017-2024.
- Mattioli AV. Lifestyle and atrial fibrillation. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2011;**9**:895-902.
- McAllister SD, Griffin G, Satin LS, Abood ME. Cannabinoid receptors can activate and inhibit G protein-coupled inwardly rectifying potassium channels in a xenopus oocyte expression system. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;**291**:618-626.
- McCormack T, McCormack K, Nadal MS, Vieira E, Ozaita A, Rudy B. The effects of *Shaker* β -subunits on the human lymphocyte K^+ channel Kv1.3. *J Biol Chem* 1999;**274**:20123-20126.
- McCormick KA, Isom LL, Ragsdale D, Smith D, Scheuer T y Catterall WA. Molecular determinants of Na^+ channel function in the extracellular domain of the $\alpha 1$ subunit. *J. Biol. Chem.* 1998;**273**:3954-3962.
- McCormick KA, Srinivasan J, White K, Scheuer T, Catterall WA. The extracellular domain of the $\beta 1$ subunit is both necessary and sufficient for $\beta 1$ -like modulation of sodium channel gating. *J Biol Chem.* 1999;**274**:32638-46.
- McCrossan ZA, Abbott GW. The MinK-related peptides. *Neuropharmacology* 2004;**47**:787-821.
- McDonald TW, Yu Z, Ming Z, Palm E, Meyers MB, Wang KW, Goldstein SAN, Fishman GI. A minK-HERG complex regulates the cardiac potassium current I_{Kr} . *Nature* 1997;**388**:289-292.
- McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA, Barker EL. A role for

- caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J Biol Chem* 2004;**279**:41991-41997.
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 1995;**50**:83-90.
- Medi C, Sparks PB, Morton JB, Kistler PM, Halloran K, Rosso R, Vohra JK, Kumar S, Kalman JM. Pulmonary vein antral isolation for paroxysmal atrial fibrillation: results from long-term follow-up. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2011;**22**:137-141.
- Meisler MH, Kearney JA. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J Clin Invest* 2005;**115**:2010-2017.
- Mendizábal VE, Adler-Graschinsky E. Cannabinoids as therapeutic agents in cardiovascular disease: a tale of passions and illusions. *Br J Pharmacol* 2007;**151**:427-440.
- Meszaros J, Ryder KO, Hart G. Transient outward current in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Am J Physiol* 1996;**271**:H2360-H2368.
- Michael G, Xiao L, Qi XY, Dobrev D, Nattel S. Remodelling of cardiac repolarization: how homeostatic responses can lead to arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2009;**81**:491-499.
- Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, Bauer JA. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001;**104**:174-180.
- Mikala G, Bahinski A, Yatani A, Tang S, Schwartz A. Differential contribution by conserved glutamate residues to an ion-selectivity site in the L-type Ca²⁺ channel pore. *FEBS Lett* 1993;**335**:265-269.
- Mikala G, Klöckner U, Varadi M, Eisefeld J, Schwartz A, Varadi G. cAMP-dependent phosphorylation sites and macroscopic activity of recombinant cardiac L-type calcium channels. *Mol Cell Biochem* 1998;**185**:95-109.
- Miller LK, Devi LA. The highs and lows of cannabinoid receptor expression in disease: mechanisms and their therapeutic implications. *Pharmacol Rev* 2011;**63**:461-470.
- Milnes JT, Madge DJ, Ford JW. New pharmacological approaches to atrial fibrillation. *Drug Discov Today* 2012;**17**:654-659.
- Mitcheson JS, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti M. A structural basis for drug induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:12329-12333.
- Mitcheson JS, Sanguinetti MC. Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cell Physiol Biochem* 1999;**9**:201-216.
- Mitra R, Morad M. Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;**83**:5340-5344.
- Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Bailey KR, Abhayaratna WP, Seward JB, Tsang TS. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation* 2006;**114**:119-125.
- Moe GK, Abildskov JA. Atrial fibrillation as a self-sustaining arrhythmia independent of focal discharge. *Am Heart J* 1959;**58**:59-70.
- Moe GK, Rheinboldt WC, Abildskov JA. A computer model of atrial fibrillation. *Am Heart J* 1964;**67**:200-220.
- Mombouli JV, Schaeffer G, Holzmann S, Kostner GM, Graier WF. Anandamide-induced mobilization of cytosolic Ca²⁺ in endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1999;**126**:1593-1600.
- Montani JP, Carroll JF, Dwyer TM, Antic V, Yang Z, Dulloo AG. Ectopic fat storage in heart, blood vessels and kidneys in the

- pathogenesis of cardiovascular diseases. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;**28**:S58-S65.
- Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, Burger F, Pelli G, Bertolotto M, Mach F, Steffens S. CB(2) cannabinoid receptor activation is cardioprotective in a mouse model of ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2009;**46**:612-620.
- Monteleone P, Castaldo E, Maj M. Neuroendocrine dysregulation of food intake in eating disorders. *Regul Pept* 2008;**149**:39-50.
- Moore SA, Nomikos GG, Dickason-Chesterfield AK, Schober DA, Schaus JM, Ying BP, Xu YC, Phebus L, Simmons RM, Li D, Iyengar S, Felder CC. Identification of a high-affinity binding site involved in the transport of endocannabinoids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;**102**:17852-17857.
- Morais-Cabral JH, Zhou Y, MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* 2001;**414**:37-42.
- Morales MJ, Castellino RC, Crews AL, Rasmusson RL, Strauss HC. A novel β subunit increases rate of inactivation of specific voltage-gated potassium channel α subunits. *J Biol Chem* 1995;**270**:6272-6277.
- Moreau C, Jacquet H, Prost AL, D'hahan N, Vivaudou M. The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. *EMBO J* 2000;**19**:6644-6651.
- Moreira FA, Crippa JA. The psychiatric side-effects of rimonabant. *Rev Bras Psiquiatr* 2009;**31**:145-153.
- Moreno I, Caballero R, González T, Arias C, Valenzuela C, Iriepa I, Gálvez E, Tamargo J, Delpón E. Effects of irbesartan on cloned potassium channels involved in human cardiac repolarization. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;**304**:862-73.
- Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Whyte L, Díaz-Arteaga A, Vázquez-Martínez R, Rotellar F, Guzmán R, Gómez-Ambrosi J, Pulido MR, Russell WR, Imbernón M, Ross RA, Malagón MM, Dieguez C, Fernández-Real JM, Frühbeck G, Nogueiras R. The L- α -lysophosphatidylinositol/GPR55 system and its potential role in human obesity. *Diabetes* 2012;**61**:281-291.
- Morgan K, Stevens EB, Shah B, Cox PJ, Dixon AK, Lee K, Pinnock RD, Hughes J, Richardson PJ, Mizuguchi K, Jackson AP. β 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;**97**:2308-2313.
- Mori Y, Matsubara H, Folco E, Siegel A, Koren G. The transcription of a mammalian voltage-gated potassium channel is regulated by cAMP in a cell-specific manner. *J Biol Chem* 1993;**268**:26482-26493.
- Mori Y, Mikala G, Varadi G, Kobayashi T, Koch S, Wakamori M, Schwartz A. Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* 1996;**72**:83-109.
- Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* 1995;**91**:1588-1595.
- Motoike HK, Liu H, Glaaser IW, Yang AS, Tateyama M, Kass RS. The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: a novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol* 2004;**123**:155-165.
- Mouslech Z, Valla V. Endocannabinoid system: An overview of its potential in current medical practice. *Neuro Endocrinol Lett* 2009;**30**:153-179.
- Mu J, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;**291**:893-902.
- Mu J, Zhuang SY, Hampson RE, Deadwyler SA. Protein kinase-dependent phosphorylation and cannabinoid receptor modulation of potassium A current (I_A) in cultured rat hippocampal neurons. *Pflugers Arch* 2000;**439**:541-546.
- Mubagwa K, Flameng W, Carmeliet E. Resting and

- action potentials of nonischemic and chronically ischemic human ventricular muscle. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994;**5**:659-671.
- Muccioli GG. Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discov Today* 2010;**15**:474-483.
- Mukhopadhyay P, Bátakai S, Rajesh M, Czifra N, Harvey-White J, Haskó G, Zsengeller Z, Gerard NP, Liaudet L, Kunos G, Pacher P. Pharmacological inhibition of CB1 cannabinoid receptor protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *J Am Coll Cardiol* 2007;**50**:528-536.
- Müller M, Szewczyk A, De Weille JR, Lazdunski M. ATP-sensitive K⁺ channels in insulinoma cells are activated by nonesterified fatty acids. *Biochemistry* 1992;**31**:4656-4661
- Müller-Ehmsen J, Näbauer M, Schwinger RH. Na⁺ channel modulating effect of the inotropic compound S(-)BDF 9196 in human myocardium. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999;**359**:60-64.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993;**365**:61-65.
- Muñoz V, Grzeda KR, Desplantez T, Pandit SV, Mironov S, Taffet SM, Rohr S, Kléber AG, Jalife J. Adenoviral expression of I_{Ks} contributes to wavebreak and fibrillatory conduction in neonatal rat ventricular cardiomyocyte monolayers. *Circ Res* 2007a;**101**:475-83.
- Muñoz V, Vaidyanathan R, Tolkacheva EG, Dhamoon AS, Taffet SM, Anumonwo JM. Kir2.3 isoform confers pH sensitivity to heteromeric Kir2.1/Kir2.3 channels in HEK293 cells. *Heart Rhythm* 2007b;**4**:487-496.
- Murai T, Kakizuka A, Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Molecular cloning and sequence analysis of human genomic DNA encoding a novel membrane protein which exhibits a slowly activating potassium channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;**161**:176-181.
- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Erdmann E. Characteristics of transient outward current in human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circ Res* 1993;**73**:386-394.
- Näbauer M, Beuckelmann DJ, Überfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 1996;**93**:168-177.
- Nabauer M, Gerth A, Limbourg T, Schneider S, Oeff M, Kirchhof P, Goette A, Lewalter T, Ravens U, Meinertz T, Breithardt G, Steinbeck G. The Registry of the German Competence NETwork on Atrial Fibrillation: patient characteristics and initial management. *Europace* 2009;**11**:423-434.
- Naccarato M, Pizzuti D, Petrosino S, Simonetto M, Ferigo L, Grandi FC, Pizzolato G, Di Marzo V. Possible Anandamide and Palmitoylethanolamide involvement in human stroke. *Lipids Health Dis* 2010;**9**:47.
- Nadal MS, Ozaita A, Amarillo Y, Vega-Saenz de Miera E, Ma Y, Mo W, Goldberg EM, Misumi Y, Ikehara Y, Neubert TA, Rudy B. The CD26-related dipeptidyl aminopeptidase-like protein DPPX is a critical component of neuronal A-type K⁺ channels. *Neuron* 2003;**37**:449-461.
- Nakahira K, Shi G, Rhodes KJ, Trimmer JS. Selective interaction of voltage-gated K⁺ channel beta-subunits with alpha-subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:7084-9.
- Narayan SM, Krummen DE, Rappel WJ. Clinical mapping approach to diagnose electrical rotors and focal impulse sources for human atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2012;**23**:447-454.
- Nattel S, Yue L, Wang Z. Cardiac ultrarapid delayed rectifiers. A novel potassium current family of functional similarity and molecular diversity. *Cell Physiol Biochem* 1999a;**9**:217-226.
- Nattel S, Singh BN. Evolution, mechanisms, and classification of antiarrhythmic drugs: focus on class III actions. *Am J Cardiol*

- 1999b;**84**:11R-19R.
- Nattel S, Li D. Ionic remodeling in the heart: pathophysiological significance and new therapeutic opportunities for atrial fibrillation. *Circ Res* 2000;**87**:440-447.
- Nattel S, Li D, Yue L. Basic mechanisms of atrial fibrillation-very new insights into very old ideas. *Annu Rev Physiol* 2000;**62**:51-77.
- Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002;**415**:219-226.
- Nattel S. Is atrial remodeling a viable target for prevention of atrial fibrillation recurrence? *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004;**15**:885-886.
- Nattel S, Frelin Y, Gaborit N, Louault C, Demolombe S. Ion-channel mRNA-expression profiling: Insights into cardiac remodeling and arrhythmic substrates. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:96-105.
- Németh B, Ledent C, Freund TF, Hájos N. CB1 receptor-dependent and -independent inhibition of excitatory postsynaptic currents in the hippocampus by WIN 55,212-2. *Neuropharmacology* 2008;**54**:51-57.
- Nerbonne JM. Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol* 2000;**525**:285-298.
- Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;**85**:1205-1253.
- Nernst W. Zur Kinetik der in Lösung befindlichen Körper: Theorie der Diffusion. *Z phys Chem* 1888;**2**:613-637.
- Nichols CG, Makhina EN, Pearson WL, Sha Q, Lopatin AN. Inward rectification and implications for cardiac excitability. *Circ Res* 1996;**78**:1-7.
- Nicholson RA, Liao C, Zheng J, David LS, Coyne L, Errington AC, Singh G, Lees G. Sodium channel inhibition by anandamide and synthetic cannabimimetics in brain. *Brain Res* 2003;**978**:194-204.
- Nicolaou VN, Papadakis JE, Karatzis EN, Dermitzaki SI, Tsakiris AK, Skoufas PD. Impact of the metabolic syndrome on atrial size in patients with new-onset atrial fibrillation. *Angiology* 2007;**58**:21-25.
- Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 1985;**316**:443-446.
- Ning Y, O'Neill K, Lan H, Pang L, Shan LX, Hawes BE, Hedrick JA. Endogenous and synthetic agonists of GPR119 differ in signalling pathways and their effects on insulin secretion in MIN6c4 insulinoma cells. *Br J Pharmacol* 2008;**155**:1056-1065.
- Nishida M, MacKinnon R. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 2002;**111**:957-965.
- Nishiyama A, Kambe F, Kamiya K, Yamaguchi S, Murata Y, Seo H, Toyama J. Effects of thyroid and glucocorticoid hormones on Kv1.5 potassium channel gene expression in the rat left ventricle. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**237**:521-526.
- Niwa N, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (*I_{to}*) expression and regulation. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:12-25.
- Noble D. The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol* 1984;**353**:1-50.
- Noda M, Suzuki H, Numa S, Stühmer W. A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett.* 1989;**259**:213-216.
- Núñez L, Vaquero M, Gómez R, Caballero R, Mateos-Cáceres P, Macaya C, Iriepa I, Gálvez E, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. Nitric oxide blocks hKv1.5 channels by S-nitrosylation and by a cyclic GMP-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 2006;**72**:80-89.
- Núñez L, Barana A, Amorós I, de la Fuente MG, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Rodríguez-García I, Mosquera I, Monserrat L, Delpón

- E, Caballero R, Castro-Beiras A, Tamargo J. p.D1690N Nav1.5 rescues p.G1748D mutation gating defects in a compound heterozygous Brugada syndrome patient. *Heart Rhythm* 2013;**10**:264-272.
- O'Connell AD, Morton MJ, Hunter M. Two-pore domain K⁺ channels-molecular sensors. *Biochim Biophys Acta* 2002;**1566**:152-161.
- O'Reilly JP, Wang SY, Kallen RG, Wang GK. Comparison of slow inactivation in human heart and rat skeletal muscle Na⁺ channel chimaeras. *J Physiol* 1999;**515**:61-73.
- Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, De Simone C, Rapino C, Dainese E, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell Mol Life Sci* 2008;**65**:840-850.
- Oddi S, Fezza F, Pasquariello N, D'Agostino A, Catanzaro G, De Simone C, Rapino C, Finazzi-Agrò A, Maccarrone M. Molecular identification of albumin and Hsp70 as cytosolic anandamide-binding proteins. *Chem Biol* 2009;**16**:624-632.
- Offertáler L, Mo FM, Bátakai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G. Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 2003;**63**:699-705.
- Ogielska EM, Zagotta WN, Hoshi T, Heinemann SH, Haab J, Aldrich RW. Cooperative subunit interactions in C-type inactivation of K⁺ channels. *Biophys J* 1995;**69**:2449-2457.
- Ohya S, Morohashi Y, Muraki K, Tomita T, Watanabe M, Iwatsubo T, Imaizumi Y. Molecular cloning and expression of the novel splice variants of K⁺ channel-interacting protein 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;**282**:96-102.
- Oka S, Nakajima K, Yamashita A, Kishimoto S, Sugiura T. Identification of GPR55 as a lysophosphatidylinositol receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;**362**:928-934.
- Oka S, Kimura S, Toshida T, Ota R, Yamashita A, Sugiura T. Lysophosphatidylinositol induces rapid phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and activating transcription factor 2 in HEK293 cells expressing GPR55 and IM-9 lymphoblastoid cells. *J Biochem* 2010;**147**:671-678.
- Oliver D, Lien CC, Soom M, Baukrowitz T, Jonas P, Fakler B. Functional conversion between A-type and delayed rectifier K⁺ channels by membrane lipids. *Science* 2004;**304**:265-270.
- Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Hum Mol Genet* 2006;**15**:2185-2191.
- Orgado JM, Fernández-Ruiz J, Romero J. The endocannabinoid system in neuropathological states. *Int Rev Psychiatry* 2009;**21**:172-180.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátakai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2005;**115**:1298-1305.
- Oudit GY, Kassiri Z, Sah R, Ramirez RJ, Zobel C, Backx PH. The molecular physiology of the cardiac transient outward potassium current (*I*_{to}) in normal and diseased myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:851-872.
- Overton HA, Babbs AJ, Doel SM, Fyfe MC, Gardner LS, Griffin G, Jackson HC, Procter MJ, Rasamison CM, Tang-Christensen M, Widdowson PS, Williams GM, Reynet C. Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell Metab* 2006;**3**:167-175.
- Oxford GS, Yeh JZ. Interactions of monovalent cations with sodium channels in squid axon. I. Modification of physiological inactivation gating. *J Gen Physiol* 1985;**85**:583-602.

- Oz M, Tchugunova YB, Dunn SM. Endogenous cannabinoid anandamide directly inhibits voltage-dependent Ca^{2+} fluxes in rabbit T-tubule membranes. *Eur J Pharmacol* 2000;**404**:13-20.
- Oz M, Tchugunova Y, Dinc M. Differential effects of endogenous and synthetic cannabinoids on voltage-dependent calcium fluxes in rabbit T-tubule membranes: comparison with fatty acids. *Eur J Pharmacol* 2004;**502**:47-58.
- Oz M. Receptor-independent effects of endocannabinoids on ion channels. *Curr Pharm Des* 2006;**12**:227-239.
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G. Blood pressure regulation by endocannabinoids and their receptors. *Neuropharmacology* 2005a;**48**:1130-1138.
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G. Cardiovascular pharmacology of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005b;**168**:599-625.
- Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 2006;**58**:389-462.
- Pacher P, Mukhopadhyay P, Mohanraj R, Godlewski G, Bátkai S, Kunos G. Modulation of the endocannabinoid system in cardiovascular disease: therapeutic potential and limitations. *Hypertension* 2008;**52**:601-607.
- Pacher P, Steffens S. The emerging role of the endocannabinoid system in cardiovascular disease. *Semin Immunopathol* 2009;**31**:63-77.
- Pan X, Ikeda SR, Lewis DL. Rat brain cannabinoid receptor modulates N-type Ca^{2+} channels in a neuronal expression system. *Mol Pharmacol* 1996;**49**:707-14.
- Panama BK, McLerie M, Lopatin AN. Heterogeneity of I_{K1} in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**293**:H3558-67.
- Pandey R, Mousawy K, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res* 2009;**60**:85-92.
- Pandit SV, Berenfeld O, Anumonwo JM, Zaritski RM, Kneller J, Nattel S, Jalife J. Ionic determinants of functional reentry in a 2-D model of human atrial cells during simulated chronic atrial fibrillation. *Biophys J* 2005;**88**:3806-3821.
- Panyi G, Sheng Z, Deutsch C. C-type inactivation of a voltage-gated K^{+} channel occurs by a cooperative mechanism. *Biophys J* 1995;**69**:896-903.
- Papazian DM, Schwarz TL, Tempel BL, Jan YN, Jan LY. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* 1987;**237**:749-753.
- Papazian DM, Timpe LC, Jan YN, Jan LY. Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature* 1991;**349**:305-310.
- Patel AJ, Honoré E. Properties and modulation of mammalian 2P domain K^{+} channels. *Trends Neurosci* 2001;**24**:339-346.
- Patel SP, Campbell DL, Strauss HC. Elucidating KChIP effects on Kv4.3 inactivation and recovery kinetics with a minimal KChIP2 isoform. *J Physiol* 2002;**545**:5-11.
- Patlak JB, Ortiz M. Slow currents through single sodium channels of the adult rat heart. *J Gen Physiol* 1985; **86**:89-104.
- Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger PA, Choe S. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat Neurosci* 2005;**8**:279-287.
- Pelleg A, Belardinelli L. Cardiac electrophysiology and pharmacology of adenosine: basic and clinical aspects. *Cardiovasc Res* 1993;**27**:54-61.
- Pereon Y, Demolombe S, Baro I, Drouin E, Charpentier F, Escande D. Differential expression of KvLQT1 isoforms across the human ventricular wall. *Am J Physiol* 2000;**278**:H1908-H1915.
- Pérez-García MT, López-López JR, González C.

- Kv β 1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O₂ sensitivity to Kv4.2 but not to *Shaker* channels. *J Gen Physiol* 1999;**113**:897-907.
- Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels. *Physiol Rev* 2003;**83**:117-161.
- Persson F, Carlsson L, Duker G, Jacobson I. Blocking characteristics of hKv1.5 and hKv4.3/hKChIP2.2 after administration of the novel antiarrhythmic compound AZD7009. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;**46**:7-17.
- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 1997;**74**:129-180.
- Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 1999;**6**:635-664.
- Pertwee RG. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001;**48**:859-867.
- Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005;**168**:1-51.
- Pertwee RG. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol* 2007;**152**:984-986.
- Pertwee RG. Ligands that target cannabinoid receptors in the brain: from THC to anandamide and beyond. *Addict Biol* 2008;**13**:147-159.
- Pertwee RG. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br J Pharmacol* 2009;**156**:397-411.
- Pertwee RG. Receptors and channels targeted by synthetic cannabinoid receptor agonists and antagonists. *Curr Med Chem* 2010;**17**:1360-1381.
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol Rev* 2010;**62**:588-631.
- Peters NS, Schilling RJ, Kanagaratnam P, Markides V. Atrial fibrillation: strategies to control, combat, and cure. *Lancet* 2002;**359**:593-603.
- Peterson BZ, Lee JS, Mulle JG, Wang Y, de Leon M, Yue DT. Critical determinants of Ca²⁺-dependent inactivation within an EF-hand motif of L-type Ca²⁺ channels. *Biophys J* 2000;**78**:1906-1920.
- Pietr M, Kozela E, Levy R, Rimmerman N, Lin YH, Stella N, Vogel Z, Juknat A. Differential changes in GPR55 during microglial cell activation. *FEBS Lett* 2009;**583**:2071-2076.
- Piomelli D, Beltramo M, Glasnapp S, Lin SY, Goutopoulos A, Xie XQ, Makriyannis A. Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;**96**:5802-5807.
- Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 2003;**4**:873-884.
- Pisanti S, Bifulco M. Endocannabinoid system modulation in cancer biology and therapy. *Pharmacol Res* 2009;**60**:107-116.
- Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canún S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R, Clark J, Deymeer F, George AL Jr, Fish FA, Hahn A, Nitu A, Ozdemir C, Serdaroglu P, Subramony SH, Wolfe G, Fu YH, Ptáček LJ. Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 2001;**105**:511-519.
- Poling JS, Rogawski MA, Salem N Jr, Vicini S. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K⁺ channels. *Neuropharmacology* 1996;**35**:983-991.
- Pond AL, Scheve BK, Benedict AT, Petrecca K, Van Wagoner DR, Shrier A, Nerbonne JM. Expression of distinct ERG proteins in rat, mouse, and human heart. Relation to functional I_{Kr} channels. *J Biol Chem* 2000;**275**:5997-6006.

- Potreau D, Gómez JP, Fares N. Depressed transient outward current in single hypertrophied cardiomyocytes isolated from the right ventricle of ferret heart. *Cardiovasc Res* 1995;**30**:440-448.
- Pound EM, Kang JX, Leaf A. Partitioning of polyunsaturated fatty acids, which prevent cardiac arrhythmias, into phospholipid cell membranes. *J Lipid Res* 2001;**42**:346-351.
- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* 1994;**368**:67-70.
- Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, Napolitano C, Anumonwo J, di Barletta MR, Gudapakkam S, Bosi G, Stramba-Badiale M, Jalife J. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 2005;**96**:800-807.
- Prystowsky EN, Camm J, Lip GY, Allessie M, Bergmann JF, Breithardt G, Brugada J, Crijns H, Ellinor PT, Mark D, Naccarelli G, Packer D, Tamargo J. The impact of new and emerging clinical data on treatment strategies for atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010;**21**:946-958.
- Pu J, Wada T, Valdivia C, Chutkow WA, Burant CF, Makielski JC. Evidence of K_{ATP} channels in native cardiac cells without SUR. *Biophys J* 2001;**80**:863-868.
- Pusch M. Increase of the single-channel conductance of KvLQT1 potassium channels induced by the association with minK. *Pflügers Arch* 1998;**437**:172-174.
- Qin D, Zhang ZH, Caref EB, Boutjdir M, Jain P, el-Sherif N. Cellular and ionic basis of arrhythmias in postinfarction remodeled ventricular myocardium. *Circ Res* 1996;**79**:461-473.
- Quercioli A, Pataky Z, Vincenti G, Makoundou V, Di Marzo V, Montecucco F, Carballo S, Thomas A, Staub C, Steffens S, Seimbille Y, Golay A, Ratib O, Harsch E, Mach F, Schindler TH. Elevated endocannabinoid plasma levels are associated with coronary circulatory dysfunction in obesity. *Eur Heart J* 2011;**32**:1369-1378.
- Radicke S, Cotella D, Graf EM, Ravens U, Wettwer E. Expression and function of dipeptidyl-aminopeptidase-like protein 6 as a putative beta-subunit of human cardiac transient outward current encoded by Kv4.3. *J Physiol* 2005;**565**:751-756.
- Radicke S, Cotella D, Graf EM, Banse U, Jost N, Varró A, Tseng GN, Ravens U, Wettwer E. Functional modulation of the transient outward current *I*_{to} by KCNE beta-subunits and regional distribution in human non-failing and failing hearts. *Cardiovasc Res* 2006;**71**:695-703.
- Radicke S, Cotella D, Bortoluzzi A, Ravens U, Sblattero D, Wettwer E. DPP10 - A new putative regulatory β subunit of *I*_{to} in failing and non-failing human heart. *Circulation* 2007;**116**:II.187 (abstract).
- Radicke S, Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Ravens U, Wettwer E, Delpón E. Effects of MiRP1 and DPP6 beta-subunits on the blockade induced by flecainide of Kv4.3/KChIP2 channels. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:774-86.
- Rajamani S, Anderson CL, Anson BD, January CT. Pharmacological rescue of human K⁺ channel long-QT2 mutations: human ether-a-go-go-related gene rescue without block. *Circulation* 2002;**105**:2830-2835.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Bátkaí S, Haskó G, Liaudet L, Huffman JW, Csiszar A, Ungvari Z, Mackie K, Chatterjee S, Pacher P. CB2-receptor stimulation attenuates TNF-alpha-induced human endothelial cell activation, transendothelial migration of monocytes, and monocyte-endothelial adhesion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**293**:H2210-2218.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Haskó G, Pacher P. Cannabinoid CB1 receptor inhibition decreases vascular smooth muscle migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;**377**:1248-1252.
- Rakhshan F, Day TA, Blakely RD, Barker EL. Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. *J Pharmacol Exp Ther*

- 2000;**292**:960-967.
- Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V. Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther* 2002;**95**:191-202.
- Randall MD, Kendall DA, O'Sullivan S. The complexities of the cardiovascular actions of cannabinoids. *Br J Pharmacol* 2004;**142**:20-26.
- Rasmusson RL, Morales MJ, Castellino RC, Zhang Y, Campbell DL, Strauss HC. C-type inactivation controls recovery in a fast inactivating cardiac K⁺ channel (Kv1.4) expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 1995;**489**:709-721.
- Rasmusson RL, Morales MJ, Wang S, Liu S, Campbell DL, Brahmajothi MV, Strauss HC. Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels. *Circ Res* 1998;**82**:739-50.
- Ravinet Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrie P. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;**284**:R345-353.
- Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 2003;**58**:32-45.
- Regan CP, Kiss L, Stump GL, McIntyre CJ, Beshore DC, Liverton NJ, Dinsmore CJ, Lynch JJ Jr. Atrial antifibrillatory effects of structurally distinct Ik_r blockers 3-[(dimethylamino)methyl]-6-methoxy-2-methyl-4-phenylisoquinolin-1(2H)-one and 2-phenyl-1,1-dipyridin-3-yl-2-pyrrolidin-1-yl-ethanol in dogs with underlying heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;**324**:322-330.
- Rensma PL, Allesie MA, Lammers WJ, Bonke FI, Schalij MJ. Length of excitation wave and susceptibility to reentrant atrial arrhythmias in normal conscious dogs. *Circ Res* 1988;**62**:395-410.
- Rettig J, Heinemann SH, Wunder F, Lorra C, Parcej DN, Dolly JO, Pongs O. Inactivation properties of voltage-gated K⁺ channels altered by presence of beta-subunit. *Nature* 1994;**369**:289-294.
- Reuter H. Divalent cations as change carriers in excitable membranes. *Prog Biophys Mol Biol* 1973;**26**:1-43.
- Rexrode KM, Manson JE, Hennekens CH. Obesity and cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 1996;**11**:490-495.
- Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem* 1998;**71**:1525-1534.
- Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Shire D, Bouaboula M, Oustric D, Barth F, Casellas P, Ferrara P, Le Fur G. Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;**278**:871-878.
- Robbe D, Alonso G, Duchamp F, Bockaert J, Manzoni OJ. Localization and mechanisms of action of cannabinoid receptors at the glutamatergic synapses of the mouse nucleus accumbens. *J Neurosci* 2001;**21**:109-116.
- Roberds SL, Tamkun MM. Cloning and tissue-specific expression of five voltage-gated potassium channel cDNAs expressed in rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;**88**:1798-1802.
- Roberds SL, Knoth KM, Po S, Blair TA, Bennett PB, Hartshorne RP, Snyders DJ, Tamkun MM. Molecular biology of the voltage-gated potassium channels of the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1993;**4**:68-80.
- Roberts R. Genomics and cardiac arrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 2006;**47**:9-21.
- Roche R, Hoareau L, Bes-Houtmann S, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2006;**126**:177-187.

- Roden DM, Balser JR, George AL Jr, Anderson ME. Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol* 2002;**64**:431-475.
- Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature* 2001;**414**:209-212.
- Romero J, Orgado JM. Cannabinoids and neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2009;**8**:440-450.
- Rosati B, Pan Z, Lypen S, Wang HS, Cohen I, Dixon JE, McKinnon D. Regulation of KChIP2 potassium channel β subunit gene expression underlies the gradient of transient outward current in canine and human ventricle. *J Physiol* 2001;**533**:119-125.
- Ross S, Peselow E. The neurobiology of addictive disorders. *Clin Neuropsychopharmacol* 2009;**32**:269-276.
- Roux B, MacKinnon R. The cavity and pore helices in the KcsA K^+ channel: electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* 1999;**285**:100-102.
- Rudy B. Slow inactivation of the sodium conductance in squid giant axons. Pronase resistance. *J Physiol* 1978;**283**:1-21.
- Rueda D, Galve-Roperh I, Haro A, Guzmán M. The CB(1) cannabinoid receptor is coupled to the activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Pharmacol* 2000;**58**:814-820.
- Ruilope LM, Després JP, Scheen A, Pi-Sunyer X, Mancía G, Zanchetti A, Van Gaal L. Effect of rimonabant on blood pressure in overweight/obese patients with/without comorbidities: analysis of pooled RIO study results. *J Hypertens* 2008;**26**:357-367.
- Ruppertsberg JP, Schröter KH, Sakmann B, Stocker M, Sewing S, Pongs O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature* 1990;**345**:535-537.
- Ruscic KJ, Miceli F, Villalba-Galea CA, Dai H, Mishina Y, Bezanilla F, Goldstein SA. IKs channels open slowly because KCNE1 accessory subunits slow the movement of S4 voltage sensors in KCNQ1 pore-forming subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;**110**:E559-566.
- Ryberg E, Vu HK, Larsson N, Groblewski T, Hjorth S, Elebring T, Sjögren S, Greasley PJ. Identification and characterisation of a novel splice variant of the human CB1 receptor. *FEBS Lett* 2005;**579**:259-264.
- Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007;**152**:1092-1101.
- Sade H, Muraki K, Ohya S, Hatano N, Imaizumi Y. Activation of large-conductance, Ca^{2+} -activated K^+ channels by cannabinoids. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;**290**:C77-86.
- Sagan S, Venance L, Torrens Y, Cordier J, Glowinski J, Giaume C. Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci* 1999;**11**:691-699.
- Saikawa T y Carmeliet E. Slow recovery of the maximal rate of rise (V_{max}) of the action potential in sheep cardiac Purkinje fibers. *Pflügers Arch*. 1982;**394**:90-93.
- Sakmann B, Noma A, Trautwein W. Acetylcholine activation of single muscarinic K^+ channel in isolated pacemaker cells of mammalian heart. *Nature* 1983;**303**:250-253.
- Samie FH, Berenfeld O, Anumonwo J, Mironov SF, Udassi S, Beaumont J, Taffet S, Pertsov AM, Jalife J. Rectification of the background potassium current: a determinant of rotor dynamics in ventricular fibrillation. *Circ Res* 2001;**89**:1216-1223.
- Sánchez C, Galve-Roperh I, Rueda D, Guzmán M. Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary

- p>astrocytes.
- Mol Pharmacol*
- 1998;
- 54**
- :834-843.
- Sánchez C, Rueda D, Ségui B, Galve-Roperh I, Levade T, Guzmán M. The CB(1) cannabinoid receptor of astrocytes is coupled to sphingomyelin hydrolysis through the adaptor protein FAN . *Mol Pharmacol* 2001;**59**:955-959.
- Sanders P, Hocini M, Jaïs P, Hsu LF, Takahashi Y, Rotter M, Scavée C, Pasquie JL, Sacher F, Rostock T, Nalliah CJ, Clémenty J, Haïssaguerre M. Characterization of focal atrial tachycardia using high-density mapping. *J Am Coll Cardiol* 2005;**46**:2088-2099.
- Sanguinetti M, Jurkiewicz N. Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol* 1990;**96**:195-215.
- Sanguinetti M, Jurkiewicz N. Delayed rectifier outward K^+ current is composed of two currents in guinea pig atrial cells. *Am J Physiol* 1991;**260**:H393-H399.
- Sanguinetti M, Jiang C, Curran ME, Keating MT. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell* 1995;**81**:299-307.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Spector PS, Keating MT. Spectrum of HERG K^+ channel dysfunction in an inherited cardiac arrhythmia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996a;**93**:2208-2212.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. Coassembly of KvLQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I_{Ks} potassium channel. *Nature* 1996b;**384**:80-83.
- Sanguinetti M, Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature* 2006;**440**:463-469.
- Sanguinetti MC. HERG1 channelopathies. *Pflugers Arch* 2010;**460**:265-276.
- Sarfraz S, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 2005;**65**:1635-1641.
- Savinainen JR, Järvinen T, Laine K, Laitinen JT. Despite substantial degradation, 2-arachidonoylglycerol is a potent full efficacy agonist mediating CB(1) receptor-dependent G-protein activation in rat cerebellar membranes. *Br J Pharmacol* 2001;**134**:664-672.
- Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'Dowd BF. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999;**64**:193-198.
- Scherf D, Blumenfeld S, Gurbuzer B, Jody A. Effect of hypercapnia on aconitine-induced atrial fibrillation and on ventricular fibrillation caused by focal cooling of the rapidly beating ventricles of the dog. *Am Heart J* 1958;**55**:733-738.
- Schimpf R, Wolpert C, Gaita F, Giustetto C, Borggrefe M. Short QT syndrome. *Cardiovasc Res* 2005;**67**:357-366.
- Schmid HH, Schmid PC, Natarajan V. N-acylated glycerophospholipids and their derivatives. *Prog Lipid Res* 1990;**29**:1-43.
- Schmid PC, Reddy PV, Natarajan V, Schmid HH. Metabolism of N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. *J Biol Chem* 1983;**258**:9302-9306.
- Schmid PC, Schwartz KD, Smith CN, Krebsbach RJ, Berdyshev EV, Schmid HH. A sensitive endocannabinoid assay. The simultaneous analysis of N-acylethanolamines and 2-monoacylglycerols. *Chem Phys Lipids* 2000;**104**:185-191.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *EMBO J* 2000;**19**:332-340.
- Schoppa NE, McCormack K, Tanouye MA, Sigworth FJ. The size of gating charge in

- p>
wild-type and mutant Shaker potassium channels.
- Science*
- 1992;
- 255**
- :1712-1715.
- Schott JJ, Alshinawi C, Kyndt F, Probst V, Hoorntje TM, Hulsbeek M, Wilde AA, Escande D, Mannens MM, Le Marec H. Cardiac conduction defects associate with mutations in SCN5A. *Nat Genet* 1999;**23**:20-21.
- Schotten U, de Haan S, Neuberger HR, Eijssbouts S, Blaauw Y, Tieleman R, Allessie M. Loss of atrial contractility is primary cause of atrial dilatation during first days of atrial fibrillation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**287**:H2324-2331.
- Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* 2011;**91**:265-325.
- Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002;**90**:939-950.
- Schreiber D, Harlfinger S, Nolden BM, Gerth CW, Jaehde U, Schömig E, Klosterkötter J, Giuffrida A, Astarita G, Piomelli D, Markus Leweke F. Determination of anandamide and other fatty acyl ethanolamides in human serum by electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2007;**361**:162-168.
- Schuhmann K, Voelker C, Höfer GF, Pflügelmeier H, Klugbauer N, Hofmann F, Romanin C, Groschner K. Essential role of the beta subunit in modulation of C-class L-type Ca^{2+} channels by intracellular pH. *FEBS Lett* 1997;**408**:75-80.
- Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, Haverkamp W, Chen Q, Sun Y, Rubie C, Hordt M, Towbin JA, Borggreffe M, Assmann G, Qu X, Somberg JC, Breithardt G, Oberti C, Funke H. KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet* 1997;**17**:267-268.
- Schuster A, Lacinová L, Klugbauer N, Ito H, Birnbaumer L, Hofmann F. The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *EMBO J* 1996;**15**:2365-2370.
- Schwartz PJ, Priori SG, Dumaine R, Napolitano C, Antzelevitch C, Stramba-Badiale M, Richard TA, Berti MR, Bloise R. A molecular link between the sudden infant death syndrome and the long-QT syndrome. *N Engl J Med* 2000; **343**:262-267.
- Schwartz GJ, Fu J, Astarita G, Li X, Gaetani S, Campolongo P, Cuomo V, Piomelli D. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. *Cell Metab* 2008;**8**:281-288.
- Schweitzer P, Siggins GR, Madamba SG. Cannabinoid modulation of neuronal activity in adult rat hippocampus. *Adv Exp Med Biol* 1999;**469**:547-552.
- Schweitzer P. Cannabinoids decrease the K^{+} M-current in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* 2000;**20**:51-58.
- Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^{+} channels. *Prog Biophys Mol Biol* 2003;**81**:133-176.
- Serôdio P, Demiera EVS, Rudy B. Cloning of a novel component of A-type K^{+} channels operating at subthreshold potentials with unique expression in heart and brain. *J Neurophysiol* 1996;**75**:2174-2179.
- Shen NV, Pfaffinger PJ. Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K^{+} channel subunit proteins. *Neuron* 1995;**14**:625-633.
- Shen W, Kurachi Y. Mechanisms of adenosine mediated actions on cellular and clinical cardiac electrophysiology. *Mayo Clin Proc* 1995;**70**:274-291.
- Shen M, Thayer SA. The cannabinoid agonist Win55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1998;**783**:77-84.
- Shen MJ, Choi EK, Tan AY, Lin SF, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS. Neural mechanisms of

- p>atrial arrhythmias.
- Nat Rev Cardiol*
- 2011;
- 9**
- :30-39.
- Shibata EF, Drury T, Refsum H, Aldrete V, Giles W. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol* 1989;**257**:H1773-81.
- Shieh CC, Coghlan M, Sullivan JP, Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000;**52**:557-594.
- Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* 1995;**270**:3726-3731.
- Shmist YA, Goncharov I, Eichler M, Shneyvays V, Isaac A, Vogel Z, Shainberg A. Delta-9-tetrahydrocannabinol protects cardiac cells from hypoxia via CB2 receptor activation and nitric oxide production. *Mol Cell Biochem* 2006;**283**:75-83.
- Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME. Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;**278**:989-999.
- Siegelbaum SA, Tsien RW, Kass RS. Role of intracellular calcium in the transient outward current of calf Purkinje fibers. *Nature* 1977;**269**:611-613.
- Siegmund SV, Uchinami H, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. Anandamide induces necrosis in primary hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005;**41**:1085-1095.
- Sigworth FJ. Voltage gating of ion channels. *Q Rev Biophys* 1994;**27**:1-40.
- Simard C, Drolet B, Yang P, Kim RB, Roden DM. Polymorphism screening in the cardiac K⁺ channel gene KCNA5. *Clin Pharmacol Ther* 2005;**77**:138-144.
- Siqueira SW, Lapa AJ, Ribeiro do Valle J. The triple effect induced by delta 9-tetrahydrocannabinol on the rat blood pressure. *Eur J Pharmacol* 1979;**58**:351-357.
- Skanes A. Vagally mediated stabilization: the latest spin on rotors in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009;**6**:1473-1474.
- Skaper SD, Buriani A, Dal Toso R, Petrelli L, Romanello S, Facci L, Leon A. The ALIAmide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;**93**:3984-3989.
- Slipetz DM, O'Neill GP, Favreau L, Dufresne C, Gallant M, Gareau Y, Guay D, Labelle M, Metters KM. Activation of the human peripheral cannabinoid receptor results in inhibition of adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol* 1995;**48**:352-361.
- Smart D, Jonsson KO, Vandevoorde S, Lambert DM, Fowler CJ. 'Entourage' effects of N-acyl ethanolamines at human vanilloid receptors. Comparison of effects upon anandamide-induced vanilloid receptor activation and upon anandamide metabolism. *Br J Pharmacol* 2002;**136**:452-458.
- Smid SD. Gastrointestinal endocannabinoid system: multifaceted roles in the healthy and inflamed intestine. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;**35**:1383-1387.
- Smith PL, Baukowitz T, Yellen G. The inward rectification mechanism of the HERG cardiac potassium channel. *Nature* 1996;**379**:833-836.
- Snyders DJ, Tamkun MM, Bennett PB. A rapidly activating and slowly inactivating potassium channel cloned from human heart: Functional analysis after stable mammalian cell culture expression. *J Gen Physiol* 1993;**101**:513-543.
- Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:377-390.
- Soh H, Goldstein SA. I SA channel complexes include four subunits each of DPP6 and Kv4.2. *J Biol Chem* 2008;**283**:15072-15077.

- Sokolova O, Kolmakova-Partensky L, Grigorieff N. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution. *Structure* 2001;**9**:215-220.
- Solinas M, Goldberg SR, Piomelli D. The endocannabinoid system in brain reward processes. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:369-383.
- Song ZH, Bonner TI. A lysine residue of the cannabinoid receptor is critical for receptor recognition by several agonists but not WIN55212-2. *Mol Pharmacol* 1996;**49**:891-896.
- Spector PS, Curran ME, Keating MT, Sanguinetti M. Class III anti-arrhythmic drugs blocks HERG, a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Open-channel block by methanosulfonanilides. *Circ Res* 1996a;**78**:499-503.
- Spector PS, Curran ME, Zou A, Keating MT, Sanguinetti MC. Fast inactivation causes rectification of the I_{Kr} channel. *J Gen Physiol* 1996b;**107**:611-619.
- Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss AJ, Schwartz PJ, Towbin JA, Vincent GM, Keating MT. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* 2000;**102**:1178-1185.
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. Cav1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 2004;**119**:19-31.
- Stanfield PR, Nakajima S, Nakajima Y. Constitutively active and G-protein coupled inward rectifier K⁺ channels: Kir2.0 and Kir3.0. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002;**145**:47-179.
- Steffens S, Veillard NR, Arnaud C, Pelli G, Burger F, Staub C, Karsak M, Zimmer A, Frossard JL, Mach F. Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* 2005;**434**:782-786.
- Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 1997;**388**:773-778.
- Sterin-Borda L, Del Zar CF, Borda E. Differential CB1 and CB2 cannabinoid receptor-inotropic response of rat isolated atria: endogenous signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 2005;**69**:1705-1713.
- Stern MD. Buffering of calcium in the vicinity of a channel pore. *Cell Calcium* 1992;**13**:183-192.
- Stern M. Epidemiology of obesity and its link to heart disease. *Metabolism* 1995;**44**(9 Suppl 3):1-3.
- Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. A population-based study of the long-term risks associated with atrial fibrillation: 20-year follow-up of the Renfrew/Paisley study. *Am J Med* 2002;**113**:359-364.
- Stoddard MF, Dawkins PR, Prince CR, Ammash NM. Left atrial appendage thrombus is not uncommon in patients with acute atrial fibrillation and a recent embolic event: a transesophageal echocardiographic study. *J Am Coll Cardiol* 1995;**25**:452-459.
- Strutz-Seeböhm N, Gutcher I, Decher N, Steinmeyer K, Lang F, Seeböhm G. Comparison of potent Kv1.5 potassium channel inhibitors reveals the molecular basis for blocking kinetics and binding mode. *Cell Physiol Biochem* 2007;**20**:791-800.
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 1989;**339**:597-603.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;**215**:89-97.
- Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca²⁺ in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem*

- Biophys Res Commun* 1996;**229**:58-64.
- Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, Yamashita A, Waku K. Inhibition by 2-arachidonoylglycerol, a novel type of possible neuromodulator, of the depolarization-induced increase in intracellular free calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**233**:207-210.
- Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Kishimoto S, Kondo S, Waku K. Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator? *Biochem Biophys Res Commun* 1998;**243**:838-843.
- Sugiura T, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 2000;**108**:89-106.
- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;**66**:173-192.
- Sugiura T, Kishimoto S, Oka S, Gokoh M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. *Prog Lipid Res* 2006;**45**:405-446.
- Sun YX, Tsuboi K, Okamoto Y, Tonai T, Murakami M, Kudo I, Ueda N. Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D. *Biochem J* 2004;**380**:749-756.
- Sun Y, Quan XQ, Fromme S, Cox RH, Zhang P, Zhang L, Guo D, Guo J, Patel C, Kowey PR, Yan GX. A novel mutation in the KCNH2 gene associated with short QT syndrome. *J Mol Cell Cardiol* 2011;**50**:433-441.
- Takeuchi S, Akita T, Takagishi Y, Watanabe E, Sasano C, Honjo H, Kodama I. Disorganization of gap junction distribution in dilated atria of patients with chronic atrial fibrillation. *Circ J* 2006;**70**:575-582.
- Takeyasu K, Tamkun MM, Siegel NR, Fambrough DM. Expression of hybrid (Na²⁺K⁺)-ATPase molecules after transfection of mouse Ltk-cells with DNA encoding the beta-subunit of an avian brain sodium pump. *J Biol Chem* 1987;**262**:10733-10740.
- Takimoto K, Levitan ES. Glucocorticoid induction of Kv1.5 K⁺ channel gene expression in ventricle of rat heart. *Circ Res* 1994;**75**:1006-13.
- Takumi T, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current. *Science* 1988;**242**:1042-5.
- Tamargo J. Drug-induced torsade de pointes: from molecular biology to bedside. *Jpn J Pharmacol* 2000;**83**:1-19.
- Tamargo J, Caballero R, Delpón E. Pharmacological approaches in the treatment of atrial fibrillation. *Curr Med Chem* 2004a;**11**:13-28.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Valenzuela C, Delpón E. Pharmacology of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res* 2004b;**62**:9-33.
- Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Delpón E. I_{Kur}/Kv1.5 channel blockers for the treatment of atrial fibrillation. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;**18**:399-416.
- Tamkun MM, Knoth KM, Walbridge JA, Kroemer H, Roden DM, Glover DM. Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K⁺ channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J* 1991;**5**:331-337.
- Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde AA, Balser JR. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* 2001;**409**:1043-1047.
- Tanaka H, Hashimoto N. A multiple ion channel blocker, NIP-142, for the treatment of atrial fibrillation. *Cardiovasc Drug Rev* 2007;**25**:342-356. [Review. Erratum in: *Cardiovasc Drug Rev* 2008;**26**(2):84].

- Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology* 2010;**215**:588-597.
- Tao X, Avalos JL, Chen J, MacKinnon R. Crystal structure of the eukaryotic strong inward-rectifier K⁺ channel Kir2.2 at 3.1 Å resolution. *Science* 2009;**326**:1668-74.
- Terlau H, Heinemann SH, Stühmer W, Pusch M, Conti F, Imoto K, Numa S. Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* 1991;**293**:93-96.
- Timpe LC, Fantl WJ. Modulation of a voltage-activated potassium channel by peptide growth factor receptors. *J Neurosci* 1994;**14**:1195-1201.
- Tomaselli GF, Marbán E. Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;**42**:270-283.
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. How far will you go to sense voltage? *Neuron* 2005;**48**:719-725.
- Topol EJ, Boussier MG, Fox KA, Creager MA, Despres JP, Easton JD, Hamm CW, Montalescot G, Steg PG, Pearson TA, Cohen E, Gaudin C, Job B, Murphy JH, Bhatt DL; CRESCENDO Investigators. Rimonabant for prevention of cardiovascular events (CRESCENDO): a randomised, multicentre, placebo-controlled trial. *Lancet* 2010;**376**:517-523.
- Trautwein W, Uchizono K. Electron microscopic and electrophysiologic study of the pacemaker in the sinoatrial node of the rabbit heart. *Zellforsch Mikrosk Anat* 1963;**61**:96-109.
- Treistman SN, Wilson A. Alkanol effects on early potassium currents in Aplysia neurons depend on chain length. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;**84**(24):9299-9303.
- Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu YH, Ptacek LJ, Tawil R. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J Clin Invest* 2002;**110**:381-388.
- Tristani-Firouzi M, Sanguinetti MC. Structural determinants and biophysical properties of HERG and KCNQ1 channel gating. *J Mol Cell Cardiol* 2003;**35**:27-35.
- Trotter BW, Nanda KK, Kett NR, Regan CP, Lynch JJ, Stump GL, Kiss L, Wang J, Spencer RH, Kane SA, White RB, Zhang R, Anderson KD, Liverton NJ, McIntyre CJ, Beshore DC, Hartman GD, Dinsmore CJ. Design and synthesis of novel isoquinoline-3-nitriles as orally bioavailable Kv1.5 antagonists for the treatment of atrial fibrillation. *J Med Chem* 2006;**49**:6954-6957.
- Tseng GN. I_{Kr}: The hERG channel. *J Mol Cell Cardiol* 2001;**33**:835-849.
- Tucker SJ, Pessia M, Adelman JP. Muscarine-gated K⁺ channel: Subunit stoichiometry and structural domains essential for G protein stimulation. *Am J Physiol* 1996;**271**:H379-H385.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 1997;**78**:43-50.
- Uebele VN, England SK, Chaudhary A, Tamkun MM, Snyders DJ. Functional differences in Kv1.5 currents expressed in mammalian cell lines are due to the presence of endogenous Kvβ2.1 subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:2406-2412.
- Ueda N, Kurahashi Y, Yamamoto S, Tokunaga T. Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide. *J Biol Chem* 1995;**270**:23823-23827.
- Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S. Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J Biol Chem* 2001;**276**:35552-35557.
- Ulbricht W. Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* 2005;**85**:1271-1301.
- Unsold B, Kerst G, Brouzos H, Hubner M, Schreiber R, Nitschke R, Greger R, Bleich M. KCNE1 reverses the response of the human K⁺ channel KCNQ1 to cytosolic

- pH changes and alters its pharmacology and sensitivity to temperature. *Pflügers Arch* 2000;**441**:368-378.
- Valenzuela C, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ. Stereoselective block of a human cardiac potassium channel (Kv1.5) by bupivacaine enantiomers. *Biophys J* 1995;**69**:418-427.
- Valenzuela C, Delpón E, Franqueza L, Gay P, Pérez O, Tamargo J, Snyders DJ. Class III antiarrhythmic effects of zatebradine. Time-, state-, use-, and voltage-dependent block of hKv1.5 channels. *Circulation* 1996;**94**:562-570.
- Vandenberg CA. Inward rectification of a potassium channel in cardiac ventricular cells depends on internal magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;**84**:2560-2564.
- Van den Bossche I, Vanheel B. Influence of cannabinoids on the delayed rectifier in freshly dissociated smooth muscle cells of the rat aorta. *Br J Pharmacol* 2000;**131**:85-93.
- Van der Stelt M, Di Marzo V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med* 2005;**7**:37-50.
- Van der Velden HMW, van der Zee L, Wijffels MC, van Leuven C, Dorland R, Vos MA, Jongsma HJ, Allessie MA. Atrial fibrillation in the goat induces changes in monophasic action potential and mRNA expression of ion channels involved in repolarization. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2000;**11**:1262-1269.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA. Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 2005;**310**:329-332.
- Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997;**80**:772-781.
- Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca²⁺ currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999;**85**:428-436.
- Van Wagoner DR, Nerbonne JM. Molecular basis of electrical remodeling in atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* 2000;**32**:1101-1117.
- Vaquero M, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Tamargo J, Delpón E. Effects of atorvastatin and simvastatin on atrial plateau currents. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**42**:931-945.
- Varga K, Lake K, Martin BR, Kunos G. Novel antagonist implicates the CB1 cannabinoid receptor in the hypotensive action of anandamide. *Eur J Pharmacol* 1995;**278**:279-283.
- Varga K, Lake KD, Huangfu D, Guyenet PG, Kunos G. Mechanism of the hypotensive action of anandamide in anesthetized rats. *Hypertension* 1996;**28**:682-686.
- Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 1998;**12**:1035-1044.
- Vázquez E, Sánchez-Perales C, Borrego F, García-Cortés MJ, Lozano C, Guzmán M, Gil JM, Borrego MJ, Pérez V. Influence of atrial fibrillation on the morbid-mortality of patients on hemodialysis. *Am Heart J* 2000;**140**:886-890.
- Veldkamp MW, Viswanathan PC, Bezzina C, Baartscheer A, Wilde AA, Balser JR. Two distinct congenital arrhythmias evoked by a multidysfunctional Na⁺ channel. *Circ Res* 2000;**86**:E91-7.
- Venance L, Piomelli D, Glowinski J, Giaume C. Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes. *Nature* 1995;**376**:590-594.
- Vidrio H, Sánchez-Salvatori MA, Medina M. Cardiovascular effects of (-)-11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;**28**:332-336.

- Vilin YY, Makita N, George AL Jr, Ruben PC. Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels. *Biophys J* 1999;**77**:1384-1393.
- Villarroel A, Schwarz TL. Inhibition of the Kv4 (Shal) family of transient K⁺ currents by arachidonic acid. *J Neurosci* 1996;**16**:2522-2532.
- Virag L, Iost N, Opincariu M, Szolnok J, Szecsi J, Bogats G, Szenohradszky P, Varro A, Papp JG. The slow component of the delayed rectifier potassium current in undiseased human ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2001;**49**:790-797.
- Voigt N, Friedrich A, Bock M, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Strasser RH, Ravens U, Dobrev D. Differential phosphorylation-dependent regulation of constitutively active and muscarinic receptor-activated IK,ACh channels in patients with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2007;**74**:426-437.
- Voigt N, Trausch A, Knaut M, Matschke K, Varró A, Van Wagoner DR, Nattel S, Ravens U, Dobrev D. Left-to-right atrial inward rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;**3**:472-480.
- Wada K, Yokotani N, Hunter C, Doi K, Wenthold RJ, Shimasaki S. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;**89**:197-201.
- Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G. Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* 1997;**390**:518-521.
- Wagner JA, Varga K, Járαι Z, Kunos G. Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension* 1999;**33**:429-434.
- Wagner JA, Abesser M, Harvey-White J, Ertl G. 2-Arachidonylglycerol acting on CB1 cannabinoid receptors mediates delayed cardioprotection induced by nitric oxide in rat isolated hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;**47**:650-655.
- Wakili R, Voigt N, Käab S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2011;**121**:2955-2968.
- Waldeck-Weiermair M, Zoratti C, Osibow K, Balenga N, Goessnitzer E, Waldhoer M, Malli R, Graier WF. Integrin clustering enables anandamide-induced Ca²⁺ signaling in endothelial cells via GPR55 by protection against CB1-receptor-triggered repression. *J Cell Sci* 2008;**121**:1704-1717.
- Wallace RH, Wang DW, Singh R, Scheffer IE, George AL Jr, Phillips HA, Saar K, Reis A, Johnson EW, Sutherland GR, Berkovic SF, Mulley JC. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺ channel β 1 subunit gene SCN1B. *Nat Genet* 1998;**19**:366-370.
- Walton M, Fozzard HA. The relation of V_{max} to I_{Na} , G_{Na} , and h infinity in a model of the cardiac Purkinje fiber. *Biophys J* 1979;**25**:407-420.
- Wanahita N, Messerli FH, Bangalore S, Gami AS, Somers VK, Steinberg JS. Atrial fibrillation and obesity--results of a meta-analysis. *Am Heart J* 2008;**155**:310-315.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes: Evidence for a novel delayed rectifier K⁺ current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ Res* 1993;**73**:1061-1076.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 1994;**28**:1540-1546.
- Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* 1995a;**80**:805-811.
- Wang Z, Fermini B, Nattel S. Effects of flecainide, quinidine, and 4-aminopyridine on transient outward and ultrarapid delayed rectifier currents in human atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 1995b;**272**:184-196.

- Wang Z, Kiehn J, Yang Q, Brown AM, Wible BA. Comparison of binding and block produced by alternatively spliced Kv β 1 subunits. *J Biol Chem* 1996;**271**:28311-28317.
- Wang HS, Brown BS, McKinnon D, Cohen IS. Molecular basis for differential sensitivity of KCNQ and I_{Ks} channels to the cognitive enhancer XE991. *Mol Pharmacol* 2000a;**57**:1218-1223.
- Wang J, Myers CD, Robertson GA. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K $^{+}$ channel. *J Gen Physiol* 2000b;**115**:749-758.
- Wang Y, Liu Y, Ito Y, Hashiguchi T, Kitajima I, Yamakuchi M, Shimizu H, Matsuo S, Imaizumi H, Maruyama I. Simultaneous measurement of anandamide and 2-arachidonoylglycerol by polymyxin B-selective adsorption and subsequent high-performance liquid chromatography analysis: increase in endogenous cannabinoids in the sera of patients with endotoxic shock. *Anal Biochem* 2001;**294**:73-82.
- Wang TJ, Parise H, Levy D, D'Agostino RB Sr, Wolf PA, Vasan RS, Benjamin EJ. Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA*. 2004;**292**:2471-2477.
- Wang H, Yan Y, Liu Q, Huang Y, Shen Y, Chen L, Chen Y, Yang Q, Hao Q, Wang K, Chai J. Structural basis for modulation of Kv4 K $^{+}$ channels by auxiliary KChIP subunits. *Nat Neurosci* 2007;**10**:32-39.
- Wang J, Ueda N. Biology of endocannabinoid synthesis system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009;**89**:112-119.
- Wang PF, Jiang LS, Bu J, Huang XJ, Song W, Du YP, He B. Cannabinoid-2 receptor activation protects against infarct and ischemia-reperfusion heart injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012;**59**:301-307.
- Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ. The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 1995;**359**:133-136.
- Watanabe H, Tanabe N, Watanabe T, Darbar D, Roden DM, Sasaki S, Aizawa Y. Metabolic syndrome and risk of development of atrial fibrillation: the Niigata preventive medicine study. *Circulation*. 2008;**117**:1255-1260. Erratum in: *Circulation*. 2010;**122**:e433.
- Weerapura M, Nattel S, Chartier D, Caballero R, Hebert TE. A comparison of currents carried by HERG, with and without coexpression of MiRP1, and the native rapid delayed rectifier current. Is MiRP1 the missing link? *J Physiol* 2002;**540**:15-27.
- Wei J, Wang DW, Alings M, Fish F, Wathen M, Roden DM, George AL Jr. Congenital long-QT syndrome caused by a novel mutation in a conserved acidic domain of the cardiac Na $^{+}$ channel. *Circulation* 1999;**99**:3165-3171.
- Weidmann S. The effect of the cardiac membrane potential on the rapid availability of the sodium-carrying system. *J Physiol* 1955;**127**:213-224.
- Weis F, Beiras-Fernandez A, Sodian R, Kaczmarek I, Reichart B, Beiras A, Schelling G, Kreth S. Substantially altered expression pattern of cannabinoid receptor 2 and activated endocannabinoid system in patients with severe heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:1187-1193.
- Westlake TM, Howlett AC, Bonner TI, Matsuda LA, Herkenham M. Cannabinoid receptor binding and messenger RNA expression in human brain: an in vitro receptor autoradiography and in situ hybridization histochemistry study of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 1994;**63**:637-652.
- Wettwer E, Amos G, Gath J, Zerkowski HR, Reidemeister JG, Ravens U. Transient outward current in human and rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1993;**27**:1662-1669.
- Wettwer E, Amos GJ, Posival H, Ravens U. Transient outward current in human ventricular myocytes of subepicardial and subendocardial origin. *Circ Res* 1994;**75**:473-482.

- Wettwer E, Hála O, Christ T, Heubach JF, Dobrev D, Knaut M, Varró A, Ravens U. Role of I_{Kur} in controlling action potential shape and contractility in the human atrium: influence of chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2004;**110**:2299-306.
- Wheal AJ, Bennett T, Randall MD, Gardiner SM. Cardiovascular effects of cannabinoids in conscious spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 2007;**152**:717-724.
- Wheal AJ, Randall MD. Effects of hypertension on vasorelaxation to endocannabinoids in vitro. *Eur J Pharmacol* 2009;**603**:79-85.
- White R, Ho WS, Bottrill FE, Ford WR, Hiley CR. Mechanisms of anandamide-induced vasorelaxation in rat isolated coronary arteries. *Br J Pharmacol* 2001;**134**:921-929.
- Wible BA, Yang Q, Kuryshv YA, Accili EA, Brown AM. Cloning and expression of a novel K^+ channel regulatory protein, KChAP. *J Biol Chem* 1998;**273**:11745-11751.
- Wible BA, Wang L, Kuryshv YA, Basu A, Haldar S, Brown AM. Increased K^+ efflux and apoptosis induced by the potassium channel modulatory protein KChAP/PIAS3 β in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2002; **277**:17852-17862.
- Wickman K, Nemec J, Gendler SJ, Clapham DE. Abnormal heart rate regulation in GIRK4 knockout mice. *Neuron* 1998;**20**:103-114.
- Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;**92**:1954-1968.
- Wiley JL, Razdan RK, Martin BR. Evaluation of the role of the arachidonic acid cascade in anandamide's in vivo effects in mice. *Life Sci* 2006;**80**:24-35.
- Williams CP, Hu N, Shen W, Mashburn AB, Murray KT. Modulation of the human Kv1.5 channel by protein kinase C activation: role of the Kv β 1.2 subunit. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;**302**:545-550.
- Winfrey, AT. Stably rotating patterns of reaction and diffusion. *Theor Chem* 1978;**4**:1-51.
- Winterberg H. Studien über herzflimmern. I. Über die wirkung des N. vagus und accelerans auf das Flimmern des Herzens. *Pflügers Arch Physiol* 1907;**117**:223-256.
- Wirth KJ, Brendel J, Steinmeyer K, Linz DK, Rütten H, Gögelein H. In vitro and in vivo effects of the atrial selective antiarrhythmic compound AVE1231. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;**49**:197-206.
- Wissmann R, Baukrowitz T, Kalbacher H, Kalbitzer HR, Ruppersberg JP, Pongs O, Antz C, Fakler B. NMR structure and functional characteristics of the hydrophilic N terminus of the potassium channel beta-subunit Kv β 1.1. *J Biol Chem* 1999;**274**:35521-35525.
- Wolf PA, Benjamin EJ, Belanger AJ, Kannel WB, Levy D, D'Agostino RB. Secular trends in the prevalence of atrial fibrillation: The Framingham Study. *Am Heart J* 1996;**131**:790-795.
- Workman AJ, Kane KA, Rankin AC. The contribution of ionic currents to changes in refractoriness of human atrial myocytes associated with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2001;**52**:226-235.
- Wu J, Lipsius S. Effects of extracellular Mg^{2+} on T- and L-type Ca^{2+} currents in single atrial myocytes. *Am J Physiol* 1990;**259**:H1842-H1850.
- Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque MM, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, Barhanin J, Chen Y. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**332**:1012-1019.
- Xiao YF, Gomez AM, Morgan JP, Lederer WJ, Leaf A. Suppression of voltage-gated L-type Ca^{2+} currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**:4182-4187.
- Xiao YF, Ke Q, Wang SY, Auktor K, Yang Y, Wang GK et al. Single point mutations

- affect fatty acid block of human myocardial sodium channel alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci* 2001;**98**:3606-3611.
- Xie LH, John SA, Ribalet B, Weiss JN. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. *J Physiol* 2008;**586**:1833-1848.
- Xu J, Yu W, Jan YN, Jan LY, Li M. Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the alpha-subunits. *J Biol Chem* 1995;**270**:24761-24768.
- Yamada M, Inanobe A, Kurachi Y. G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacol Rev* 1998;**50**:723-760.
- Yang NB, Horn R. Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channel. *Neuron* 1995;**15**:213-218.
- Yang T, Kupersmidt S, Roden DM. Anti-minK antisense decreases the amplitude of the rapidly activating cardiac delayed rectifier K⁺ current. *Circ Res* 1995;**77**:1246-1253.
- Yang N, George AL Jr, Horn R. Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* 1996;**16**:113-122.
- Yang EK, Alvira MR, Levitan ES, Takimoto K. Kvβ subunits increase expression of Kv4.3 channels by interacting with their C termini. *J Biol Chem* 2001;**276**:4839-4844.
- Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004;**75**:899-905.
- Yang Y, Li J, Lin X, Yang Y, Hong K, Wang L, Liu J, Li L, Yan D, Liang D, Xiao J, Jin H, Wu J, Zhang Y, Chen YH. Novel KCNA5 loss-of-function mutations responsible for atrial fibrillation. *J Hum Genet* 2009;**54**:277-283.
- Yeh YH, Qi X, Shiroshita-Takeshita A, Liu J, Maguy A, Chartier D, Hebert T, Wang Z, Nattel S. Atrial tachycardia induces remodelling of muscarinic receptors and their coupled potassium currents in canine left atrial and pulmonary vein cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 2007;**152**:1021-1032.
- Yellen G, Jurman ME, Abramson T, MacKinnon R. Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* 1991;**251**:939-942.
- Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 2002;**419**:35-42.
- Yeola SW, Rich TC, Uebele VN, Tamkun MM, Snyders DJ. Molecular analysis of a binding site for quinidine in a human cardiac delayed rectifier K⁺ channel. Role of S6 in antiarrhythmic drug binding. *Circ Res* 1996;**78**:1105-1114.
- Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, Sperelakis N. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;**274**:C25-37.
- Yool AJ, Schwarz TL. Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* 1991;**349**:700-704.
- Yu SP, Kerchner GA. Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Neurosci Res* 1998;**52**:612-617.
- Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 2003;**4**:207.
- Yuan W, Ginsburg KS, Bers DM. Comparison of sarcolemmal calcium channel current in rabbit and rat ventricular myocytes. *J Physiol* 1996;**493**:733-746.
- Yue L, Feng JL, Wang Z, Nattel S. Effects of ambasilide, quinidine, flecainide and verapamil on ultra-rapid delayed rectifier potassium currents in canine atrial myocytes. *Cardiovasc Res* 2000;**46**:151-161.
- Zacharias A, Schwann TA, Riordan CJ, Durham SJ, Shah AS, Habib RH. Obesity and risk of new-

- p>onset atrial fibrillation after cardiac surgery.
- Circulation*
- 2005;
- 112**
- :3247-3255.
- Zagotta WN, Hoshi T, Aldrich RW. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* 1990;**250**:568-571.
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 1994;**372**:97-100.
- Zhang X, Anderson JW, Fedida D. Characterization of nifedipine block of the human heart delayed rectifier, hKv1.5. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;**281**:1247-1256.
- Zhang M, Jiang M, Tseng GN. MinK-related peptide 1 associates with Kv4.2 and modulates its gating function: potential role as β subunit of cardiac transient outward channel? *Circ Res* 2001;**88**:1012-1019.
- Zhang Y, Han H, Wang J, Wang H, Yang B, Wang Z. Impairment of human ether-a-go-go-related gene (HERG) K^+ channel function by hypoglycemia and hyperglycemia. Similar phenotypes but different mechanisms. *J Biol Chem* 2003;**278**:10417-10426.
- Zhang DF, Liang B, Lin J, Liu B, Zhou QS, Yang YQ. KCNE3 R53H substitution in familial atrial fibrillation. *Chin Med J (Engl)* 2005;**118**:1735-1738.
- Zhou Z, Gong Q, Epstein ML, January CT. HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem* 1998;**273**:21061-21066.
- Zhou M, Morais-Cabral JH, Mann S, MacKinnon R. Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 2001;**411**:657-661.
- Zhou Y, MacKinnon R. The occupancy of ions in the K^+ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. *J Mol Biol* 2003;**333**:965-975.
- Zicha S, Xiao L, Stafford S, Cha TJ, Han W, Varro A, Nattel S. Transmural expression of transient outward potassium current subunits in normal and failing canine and human hearts. *J Physiol* 2004;**561**:735-748.
- Zoratti C, Kipmen-Korgun D, Osibow K, Malli R, Graier WF. Anandamide initiates Ca^{2+} signaling via CB2 receptor linked to phospholipase C in calf pulmonary endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2003;**140**:1351-1362.
- Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 1999;**399**:159-16.

Abreviaturas

2-AG: 2-araquidonoilglicerol	C_m : Capacitancia de la membrana
4-AP: 4-aminopiridina	C-terminal: Carboxilo-terminal
AA: Ácido araquidónico	Ct: Ciclo umbral en el que la fluorescencia de la muestra se hace detectable por encima del fondo
AC: Adenilato ciclasa	CTX: Caribdotoxina
Ach: Acetilcolina	D: Dominio
AD: Aurícula derecha	DAG: Diacilglicerol
ADN: Ácido desoxirribonucleico	DE: Desviación estándar
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario	DHP: 1,4-Dihidropiridinas
ADP: Adenosín difosfato	DIA: Dominio de interacción α
AEA: <i>N</i> -araquidonoiletanolamina (Anandamida)	DIB: Dominio de interacción β
AI: Aurícula izquierda	DMEM: Medio Eagle Modificado de Dulbecco
AKAP: Proteína de anclaje a la PKA	DMSO: Dimetilsulfóxido
AM281: 1-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil- <i>N</i> -4-morfolinil-1 <i>H</i> -pirazol-3-carboxamida	DPA: Duración del potencial de acción
AM630: 6-Iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1 <i>H</i> -indol-3-il](4-metoxifenil)metanona	DPA ₂₀ : medida al 20% de la repolarización
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico	DPA ₅₀ : medida al 50% de la repolarización
AO: Ácido oleico	DPA ₉₀ : medida al 90% de la repolarización
AP: Ácido palmítico	DPP: Proteínas dipeptidilpeptidasas
ARN: Ácido ribonucleico	DTX: Dendrotoxina
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero	ECG: Electrocardiograma
ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico	EEM: Error estándar de la media
AS: Ácido esteárico	EGTA: Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetiléter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
AsODN: Oligonucleótidos antisentido	E_K : Potencial de equilibrio (o de Nernst) para el K^+
ATP: Adenosín trifosfato	E_m : Potencial de membrana
AV: Aurículo-ventricular	ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares
BAPTA: Ácido 1,2-Bis(2-aminofenoxi)etano- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético	F : Constante de Faraday
BK _{Ca} : Canales de K^+ activados por Ca^{2+} de conductancia alta	f : Porcentaje de aumento/bloqueo
$[Ca^{2+}]_e$: Concentración de Ca^{2+} extracelular	FA: Fibrilación auricular
$[Ca^{2+}]_i$: Concentración de Ca^{2+} intracelular	FAAH: Amidohidrolasa de ácidos grasos
CaM: Calmodulina	FAC: Fibrilación auricular crónica
CB: Cannabinoides	FV: Fibrilación ventricular
CB ₁ : Receptor de cannabinoides tipo 1	ΔG : Energía de Gibbs
CB ₂ : Receptor de cannabinoides tipo 2	G: Conductancia
CE ₅₀ : Concentración eficaz necesaria para originar la mitad de la respuesta máxima	GAPDH: Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
CHO: Células de ovario de hámster chino	GMPc: Guanosín monofosfato cíclico
CI ₅₀ : Concentración necesaria para inhibir la mitad del efecto total	HCN: Canales activados por la hiperpolarización y regulados por nucleótidos cíclicos
	HEK293: Células embrionarias humanas de riñón
	HEPES: Ácido <i>N</i> -2-hidroxi-etilpiperacina- <i>N'</i> -2'-etanesulfónico

hERG: <i>Human Ether-à-go-go Related Gene</i>	Kv: Canales de K^+ dependientes de voltaje
HTA: Hipertensión arterial	Log D: Coeficiente de distribución
HUGO: <i>HUman Genome Organization</i>	Log P: Coeficiente de partición
HVA: <i>High-Voltage Activated</i>	LPI: L- α -lisofosfatidilinositol
<i>I</i> : Intensidad de corriente macroscópica	<i>Ltk</i> : Fibroblastos de ratón carentes de tirosina quinasa
<i>i</i> : Intensidad de corriente unitaria	LVA: <i>Low-Voltage Activated</i>
I_A : Corriente transitoria de salida de K^+ neuronal	MAGL: Monoacilglicerol lipase
I_{Ca} : Corriente de entrada de Ca^{2+}	MAPK: Quinasas activadas por mitógenos
$I_{Ca,L}$: generada por canales tipo L	MEM: Medio mínimo esencial de Eagle
$I_{Ca,T}$: generada por canales tipo T	MetAEA: R-(+)-meta-anandamida
I_f : Corriente hiperpolarizante marcapasos (“ <i>funny</i> ”)	minK: <i>Minimal K⁺ channel subunit</i>
Ig: Inmunoglobulina	MiRP: <i>MinK-Related Peptides</i>
$I_{hKv1.5}$: Corriente de K^+ generada por canales hKv1.5	MMTV: Virus del tumor mamario murino
I_{K1} : Corriente de K^+ con rectificación interna	$[Na^+]_e$: Concentración de Na^+ extracelular
$I_{K,Ach}$: Corriente de salida de K^+ activada por ACh	NAB: <i>N-terminal A and B box</i>
$I_{K,ATP}$: Corriente de salida de K^+ sensible a ATP	NADPH: Nicotinamida adenín dinucleótido
I_{Kr} : Corriente de salida de K^+ rectificadora tardía de activación rápida	n_H : Coeficiente de Hill
I_{Ks} : Corriente de salida de K^+ rectificadora tardía de activación lenta	NO: Óxido nítrico
I_{Kur} : Corriente de salida de K^+ rectificadora tardía de activación ultrarrápida	N-terminal: Amino-terminal
$I_{Kv7.1}$: Corriente de K^+ generada por canales Kv7.1	OEA: Oleoiletanolamida
I_M : Corriente de K^+ de inactivación lenta en neuronas	P_{ion} : Permeabilidad
I_{Na} : Corriente de entrada de Na^+	PA: Potencial de acción
$[ion]_e$: Concentración extracelular de iones	PA-DPH: Sonda fluorescente 2-carboxietil-1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
$[ion]_i$: Concentración intracelular de iones	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
IP_3 : Inositol 1,4,5-trifosfato	PEA: Palmitoiletanolamida
I_{to1} : Corriente transitoria de salida de K^+ cardíaca	PIP_2 : Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
I_{to2} : Corriente transitoria de Cl^- activada por Ca^{2+}	PKA: Proteína quinasa dependiente de AMPc
I-V: Relación corriente-voltaje	PKC: Proteína quinasa C
JNK/SAPK: Quinasas del extremo N-terminal de c-Jun/ Quinasas activadas por estrés	PKG: Proteína cinasa dependiente de GMPc
<i>k</i> : Valor de la pendiente de la curva	PLC: Fosfolipasa C
$[K^+]_e$: Concentración de K^+ extracelular	PMA: Forbol-12-miristato-13-acetato
$[K^+]_i$: Concentración de K^+ intracelular	PPAR: Receptor nuclear activado por proliferador de peroxisomas
KChAP: <i>K⁺ Channel Accessory Protein</i>	PR: Potencial de reposo
KChIP: <i>Kv Channel Interacting Protein</i>	PREA: Periodo refractario efectivo auricular
Kir: Canales de K^+ rectificadores internos	PTX: Toxina pertussis
	qPCR: PCR cuantitativa
	<i>R</i> : Constante de los gases

Abreviaturas

R: Resistencia	T: Temperatura absoluta
RMB: Rimonabant	TALK: <i>TWIK-related ALkalosis-activated K⁺ channels</i>
r _{ss} : Anisotropía de fluorescencia en estado estacionario	TASK: <i>TWIK-related Acid-Sensitive K⁺ channels</i>
RS: Ritmo sinusal	TEA: Tetraetilamonio
r _(t) : Anisotropía de fluorescencia con resolución temporal	THC: Δ9-tetrahidrocannabinol
RT-PCR: PCR por transcripción inversa	THIK: <i>Tandem pore domain Halothane Inhibited K⁺ channel</i>
r _∞ : Anisotropía residual o límite	TM: Transmembrana
SA: Senoauricular	TRAAK: <i>TWIK-Related Arachidonic Acid-stimulated K⁺ channels</i>
SBr: Síndrome de Brugada	TREK: <i>TWIK-RElated K⁺ channel</i>
SCE: Sistema endocannabinoide o sistema cannabinoide endógeno	TTX: Tetrodotoxina
SEA: Estearoiletanolamida	TWIK: <i>Tandem of P domains in Weak Inward rectifier K⁺ channels</i>
SJLN: Síndrome de Jervell y Lange-Nielsen	V: Voltaje
SNC: Sistema nervioso central	V _h : Punto medio de activación/inactivación
SNP: Sistema nervioso periférico	WT: <i>Wild type</i>
SQTC: Síndrome de QT corto	z: Valencia del ion
SQTL: Síndrome de QT largo	
SRT: Síndrome de repolarización temprana	
SUR: Receptor de sulfonilureas	
τ: Constante de tiempo	

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral han aparecido publicados previamente formando parte del siguiente artículo:

Barana A*, Amorós I*, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP, Blázquez C, Guzmán M, Delpón E, Tamargo J. “Endocannabinoids and endocannabinoid-related compounds block human cardiac Kv1.5 channels in a cannabinoid receptor-independent manner”. *Cardiovasc Res* 2010;**85**:56-67.

Además, durante su período de formación predoctoral, la doctoranda ha contribuido a la publicación de los siguientes artículos:

Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Amorós I, **Barana A**, de Prada T, Macaya C, Maroto L, Rodríguez E, Caballero R, López-Farré A, Tamargo J, Delpón E. “Nitric oxide inhibits Kv4.3 and human cardiac transient outward potassium current (I_{to1})”. *Cardiovasc Res* 2008;**80**:375-384.

Tamargo J, Caballero R, Gómez R, **Barana A**, Amorós I, Delpón E. “Investigational positive inotropic agents for acute heart failure”. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2009;**9**:193-205.

Gómez R, Caballero R, **Barana A**, Amorós I, Calvo E, López JA, Klein H, Vaquero M, Osuna L, Atienza F, Almendral J, Pinto A, Tamargo J, Delpón E. “Nitric oxide increases cardiac I_{K1} by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels”. *Circ Res* 2009;**105**:383-392.

Amorós I*, **Barana A***, Caballero R, Gómez R, Osuna L, Lillo MP, Tamargo J, Delpón E. “Endocannabinoids and cannabinoid analogues block human cardiac Kv4.3 channels in a receptor-independent manner”. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:201-210.

Tamargo J, Amorós I, **Barana A**, Caballero R, Delpón E. “New investigational drugs for the management of acute heart failure syndromes”. *Curr Med Chem* 2010;**17**:363-390.

Caballero R, de la Fuente MG, Gómez R, **Barana A**, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Osuna L, Almendral J, Atienza F, Fernández-Avilés F, Pita A, Rodríguez-Roda J, Pinto Á, Tamargo J, Delpón E. “In humans, chronic atrial fibrillation decreases the transient outward current and ultrarapid component of the delayed rectifier current differentially on each Atria and increases

the slow component of the delayed rectifier current in both". *J Am Coll Cardiol* 2010;**55**:2346-2354.

Caballero R, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Amorós I, **Barana A**, de la Fuente MG, Osuna L, Duarte J, López-Izquierdo A, Moraleda I, Gálvez E, Sánchez-Chapula J, Tamargo J, Delpón E. "Flecainide increases Kir2.1 currents by interacting with cysteine 311 decreasing the polyamine-induced rectification". *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;**107**:15631-15636.

Amorós I, Jiménez-Jáimez J, Tercedor L, **Barana A**, Gómez R, de la Fuente MG, Dolz-Gaitón P, Alvarez M, Martínez-Espín E, Lorente JA, Melgares R, Tamargo J, Delpón E, Caballero R. "Functional effects of a missense mutation in HERG associated with type 2 Long QT syndrome". *Heart Rhythm* 2011;**8**:463-470.

González de la Fuente M*, **Barana A***, Gómez R, Amorós I, Dolz-Gaitón P, Sacristán S, Atienza F, Pita A, Pinto A, Fernández-Avilés F, Caballero R, Tamargo J, Delpón E. "Chronic Atrial Fibrillation Up-regulates β 1-adrenoceptors Affecting Repolarizing Currents and Action Potential Duration *Cardiovasc Res*. 2013;**97**(2):379-88.

Núñez L, **Barana A***, Amorós I, González de la Fuente M, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Rodríguez-García I, Mosquera I, Monserrat L, Delpón E, Caballero R, Castro-Beiras A, Tamargo J. p.D1690N Nav1.5 rescues p.G1748D mutation gating defects in a compound heterozygous Brugada syndrome patient. *Heart Rhythm*. 2013;**10**(2):264-72.

Amorós I, Dolz-Gaitón P, Gómez R, Matamoros M, **Barana A**, de la Fuente MG, Núñez M, Pérez-Hernández M, Moraleda I, Gálvez E, Iriepa I, Tamargo J, Caballero R, Delpón E. Propafenone blocks human cardiac Kir2.x channels by decreasing the negative electrostatic charge in the cytoplasmic pore. *Biochem Pharmacol*. 2013;**86**:267-278.

Dolz-Gaitón P, Núñez M, Núñez L, **Barana A**, Amorós I, Matamoros M, Pérez-Hernández M, González de la Fuente M, Alvarez-López M, Macías-Ruiz R, Tercedor-Sánchez L, Jiménez-Jáimez J, Delpón E, Caballero R, Tamargo J. Functional characterization of a novel frameshift mutation in the C-terminus of the Nav1.5 channel underlying a Brugada syndrome with variable expression in a Spanish family. *PLoS One* 2013;**8**:e81493.

